

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry

Edited by
Agnes Henschen, Klaus-Peter Hupe,
Friedrich Lottspeich, Wolfgang Voelter

VCH Verlagsgesellschaft
Weinheim

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В БИОХИМИИ

Редакторы

А. ХЕНШЕН, К.-П. ХУПЕ,
Ф. ЛОТШПАЙХ, В. ВЁЛЬТЕР

Перевод с английского
д-ра хим. наук
А. П. СЕНИЦЫНА

под редакцией
чл.-корр. АН СССР
И. В. БЕРЕЗИНА



МОСКВА «МИР» 1988

ББК 28.072
В93
УДК 543+577.1

Авторы: Бауэр Г., Энгельгард Х., Хеншен А., Хостетман К., Хостетман М., Хупе К.-П., Кронбах Т., Либих Х., Лотшпайх Ф., Мейер Р., Мюхлер Х., Розинг Г., Шён У., Шотт Г., Шренкер Х., Штайнмюллер Д., Тевини М., Вёлтер В., Зех К.

Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: Пер. с англ./Под ред. А. Хеншен и др. — М.: Мир, 1988. — 688 с., ил.
ISBN 5-03-001337-7

Книга коллектива авторов (ФРГ, Швейцария, Австрия) посвящена широко применяемому эффективному методу анализа сложных смесей веществ. В ней изложены основные положения и принципы хроматографического разделения, обобщен и систематизирован широкий экспериментальный материал по ВЭЖХ, дана обширная подборка литературы по основным областям применения ВЭЖХ.

Для химиков и биохимиков широкого профиля — работников исследовательских и промышленных лабораторий, работников аналитических лабораторий пищевой промышленности и медицинских учреждений, студентов вузов химического и биологического профиля.

Г 2001040000-196
041(01)-88 132-88, ч. 1

ББК 28.072

Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001337-7 (русск.)
ISBN 0-89573-066-9 (англ.)

© VCH Verlagsgesellschaft mbH,
D-6940 Weinheim (Federal Republic
of Germany), 1985

© перевод на русский язык, «Мир»,
1988

Предисловие редактора перевода

Как способ анализа сложных смесей веществ высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) появилась не более четверти века назад. Первые приборы ВЭЖХ были созданы специально для биохимиков (аминокислотный анализатор, анализатор нуклеиновых кислот). С тех пор этот метод начал применяться практически во всех областях химии, а для биохимиков ВЭЖХ стала практически основным методом исследований. За прошедшие годы ученые всего мира непрерывно работали над улучшением характеристик хроматографических носителей, повышением качества насосов, разработкой новых детекторов, созданием методик разделения еще более сложных смесей природных соединений. Специально созданные носители для биохимических исследований, позволяющие сохранять до 90—100% физиологической активности исследуемых соединений, еще выше подняли роль ВЭЖХ в биохимии и молекулярной биологии.

Такое активное развитие исследовательского метода вызвало появление большого количества литературы по этой теме. Но, к сожалению, большая часть изданий была посвящена либо аппаратуре и неподвижным фазам, выпускаемым какой-нибудь одной фирмой (обычно это руководства фирм), либо какому-нибудь одному аспекту использования ВЭЖХ в научных исследованиях (монографии специалистов в различных областях химии и биохимии, использующих ВЭЖХ в своей работе). Такое положение вполне естественно, так как трудно ожидать, что один или небольшая группа авторов способны написать книгу, дающую описание методов и практические рекомендации сразу во всех основных областях применения ВЭЖХ. В то же время испытывается большая необходимость в таком издании, которое могло бы быть одновременно учебником, где изложены основные положения и принципы хроматографического разделения веществ, справочником по приборам и методам, а также содержало подборку литературы по основным областям применения ВЭЖХ.

Данная книга, написанная коллективом ученых, в очень большой степени удовлетворяет всем этим требованиям.

Хотя разные главы написаны различными авторами — специалистами по разделению отдельных типов соединений, внутренняя их структура очень близка и подчинена основной идее книги — созданию подробного практического руководства по ВЭЖХ природных соединений.

Рассмотрим эту структуру на примере гл. 4 «Аминокислоты, пептиды, белки». Как и следует из названия, глава разделяется на три раздела, тоже очень близких по форме. Обратимся к разд. 4.3 «Белки». В нем описаны все современные методы анализа белков с помощью ВЭЖХ: хроматография на обращенных и нормальных фазах, ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография и аффинная хроматография. Для каждого метода перечислены неподвижные фазы, приведены требования к ним и к подвижной фазе, описаны методики проведения экспериментов, даны указания, каким стадиям эксперимента следует уделить особое внимание. Глава содержит большое количество таблиц, в которых сравниваются носители, элюенты и методы обнаружения, применяемые для решения различных задач по разделению белковых смесей. Все положения, изложенные в главе, иллюстрированы большим числом хроматограмм, взятых из оригинальных работ. Таким образом, читатель может получить всю интересующую его информацию и сравнить результаты своих работ с опубликованными данными. В конце каждой главы приводится обширный (100—400 наименований) список цитируемых работ, что позволяет подчеркнуть еще один аспект данной книги — она является не только учебником и справочником, но и библиографическим обзором по ВЭЖХ. В конце книги приведен полный список соединений, методы хроматографического анализа которых в ней рассматриваются, что значительно облегчает поиск необходимой исследователю методики.

Как уже говорилось, книга написана как подробный справочник по ВЭЖХ. Учитывая возрастающий интерес к этому методу исследований, а также появление все большего числа различных приборов и носителей, следует признать, что она очень своевременна. Биохимики, да и не только биохимики, уже давно ждут такого развернутого методического руководства. Следует отметить удачное построение книги — авторы не стали разделять вопросы теории хроматографического разделения, приборного оформления эксперимента и практических рекомендаций по хроматографическому анализу различных типов соединений, что позволяет использовать ее как на стадии подготовки эксперимента, выбора метода разделения, типа носителя, элюента, детектора, так и на стадии анализа полученных результатов.

Основная ценность книги состоит в обобщении и систематизации обширного экспериментального материала по ВЭЖХ.

Ее составителям удалось избежать основного недостатка, типичного для коллективных монографий,— разноплановости изложения. Наряду с всесторонним анализом проблем ВЭЖХ дается подробное описание различных методических тонкостей, которые зачастую играют большую роль при проведении анализов. Несколько подробнее можно было бы описать препаративные методы очистки веществ, но препаративные методики часто так сильно отличаются от аналитических, что авторы, по-видимому, сознательно не стали углубляться в рассмотрение этого вопроса.

В целом настоящая монография отражает современное состояние метода ВЭЖХ и, как верно отмечено в предисловии, является «введением в теоретические и инструментальные принципы ВЭЖХ и далее дает подробные методы ее применения для исследования различных групп соединений, представляющих интерес для биохимиков». Книга представляет огромный практический интерес не только для биохимиков, но и для всех химиков, которые применяют ВЭЖХ в своих исследованиях. Ее можно рекомендовать также студентам вузов химических специальностей как учебное руководство по проведению хроматографических экспериментов.

И. Березин

Предисловие

Трудно сказать, как бы шло развитие биохимии, если бы исследователи не располагали таким аналитическим методом, как хроматография.

Особенно большую роль в биохимии играет жидкостная хроматография — все ее варианты, а с появлением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) аналитические исследования в области биохимии, как и во многих других областях химии, начали проводиться на новом уровне. В течение последнего десятилетия наиболее важные для аналитического применения показатели ВЭЖХ — эффективность и скорость разделения, предел обнаружения и др. — были улучшены примерно на порядок, и в настоящее время ВЭЖХ можно использовать как микроаналитический метод и работать с очень малыми пробами.

Основы метода, получившего впоследствии название высокоэффективной жидкостной хроматографии, были заложены в начале шестидесятых годов. Именно в это время были 1) развиты представления о кинетике и термодинамике процессов разделения и сформулированы условия заполнения колонок, характеризующихся высокой селективностью и эффективностью, и 2) создано оборудование, позволившее осуществить непрерывный и автоматизированный процесс хроматографии. Первыми хроматографами, поступившими на рынок, были аминокислотный анализатор, разработанный Муром и его коллегами, и анализатор нуклеиновых кислот, основой для создания которого послужили работы Хорвата и соавторов*. Таким образом, инструментальное оснащение и практические методики использования ВЭЖХ отрабатывались при проведении именно биохимических исследований. К настоящему времени ВЭЖХ получила широкое распространение практически во всех областях химии.

Благодаря высокому уровню развития экспериментальной техники и инструментального оснащения современная ВЭЖХ

* Библиография приведена в конце гл. 1.

позволяет с большой степенью надежности и воспроизводимости решать сложные аналитические задачи, часто возникающие в биохимии. Число биохимиков и биохимических лабораторий, использующих ВЭЖХ, постоянно увеличивается, и есть основания считать, что такая тенденция сохранится и в будущем. По-видимому, настало время оценить ВЭЖХ как аналитический метод биохимии. В этой книге мы после краткого изложения основ теории и принципов инструментального оснащения ВЭЖХ подробно рассмотрим применение ВЭЖХ для анализа и разделения различных классов и групп соединений, представляющих интерес для биохимика.

Мюнхен, Вальдброн и Тюбинген,
октябрь 1984

А. Хеншен
К.-П. Хупе
Ф. Лотшпайх
В. Вёлтер

Основы теории и основные понятия хроматографии

К. П. Хуне (К.-Р. Нуре)

1.1. Введение

Данная глава представляет собой краткое введение в теорию хроматографических процессов. В ней объяснены понятия и определения, используемые в последующих главах, дано количественное описание процессов разделения, рассмотрены термодинамические и кинетические механизмы хроматографии. Свойства различных подвижных и неподвижных фаз обсуждены в гл. 2.

Для более глубокого изучения теории жидкостной хроматографии можно рекомендовать следующие учебники [1—3].

Номенклатура и обозначения, принятые в данной книге, соответствуют рекомендациям Американского общества испытания материалов (ASTM) [4], подробно прокомментированым Эттре [5].

1.2. Удерживание

Хроматография — это метод разделения веществ. После разделения смеси на хроматографической колонке на отдельные компоненты при помощи детекторов проводят их качественную и (или) количественную идентификацию. Отрабатывая методику хроматографического разделения, следует добиваться выполнения двух условий — разделение должно быть достаточно хорошим при минимально допустимых затратах времени. На практике необходимо учитывать и третье условие — имеется в виду ограничение на предельное давление, при котором проводят разделение, накладываемое техническими возможностями насосов и другого хроматографического оборудования.

Разделение смеси на отдельные компоненты происходит в результате их различного физического и химического взаимодействия с подвижной (элюентом) и неподвижной (насадкой) фазами.

Время удерживания и удерживаемый объем связаны следующей зависимостью:

$$F = V_R/t_R = V_M/t_M \quad (1)$$

где F — объемная скорость, мл/мин.

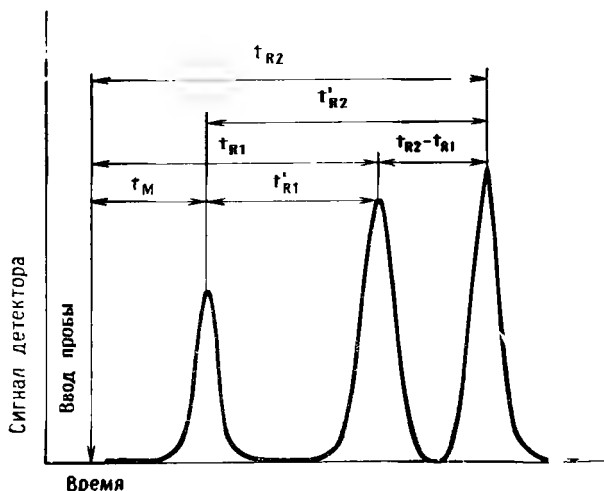


Рис. 1.1. Определение хроматографического времени удерживания.

Скорость перемещения по колонке фронта подвижной фазы, или линейная скорость u , определяется следующим отношением:

$$u = F/A_c = l/t_M \quad (2)$$

где A_c — площадь сечения колонки, а l — ее длина.

На рис. 1.1 приведены важнейшие параметры, характеризующие разделение, а именно: t_R — время удерживания (время между нанесением пробы на колонку и выходом из нее какого-либо конкретного компонента разделяемой смеси), V_R — объем удерживания (объем подвижной фазы, прошедший через колонку за время t_R), t_M — мертвое время колонки (время удерживания несорбирующегося вещества), V_M — мертвый объем колонки (объем подвижной фазы в колонке).

По мере перемещения по хроматографической колонке компоненты разделяемой смеси постоянно флуктуируют из подвижной фазы в неподвижную и обратно. Если они находятся в подвижной фазе, то перемещаются вместе с нею со скоростью u , если же компоненты сорбируются неподвижной фазой, то их перемещение прерывается. Кажущаяся средняя скорость перемещения соединений по колонке определяется выражением

$$u_x = l/t_R \quad (3)$$

Время удерживания (t_R) складывается из времени пребывания молекул в подвижной t_M и на неподвижных фазах t'_R :

$$t_R = t_M + t'_R \quad (4)$$

Отношение t'_R/t_M — это важная термодинамическая характеристика, описывающая взаимодействие разделяемых компонентов

и хроматографической системы (под хроматографической системой подразумевают в данном случае подвижную и неподвижную фазы). В равновесных условиях t_R'/t_M отражает относительное количество молекул разделяемого вещества, находящихся в подвижной и неподвижной фазах. Поэтому отношение t_R'/t_M получило название отношения распределения масс, но, к сожалению, более распространено другое его название — коэффициент емкости (коэффициент извлечения) k :

$$k = t_R'/t_M = (t_R - t_M)/t_M = (V_R - V_M)/V_M \quad (5)$$

После преобразования уравнения (5) получаем выражение, связывающее коэффициент емкости и время удерживания:

$$t_R = t_M(k + 1) \quad (6)$$

Время удерживания данного вещества при заданной объемной скорости может использоваться для его идентификации.

Коэффициент емкости связан с константой распределения K данного вещества через «фазовое отношение». Константа распределения K — это отношение концентрации вещества c в неподвижной S и подвижной M фазах:

$$K = c_S/c_M \quad (7)$$

Фазовое отношение определяют как отношение объема подвижной фазы в колонке V_M к объему неподвижной фазы V_S :

$$\beta = V_M/V_S \quad (8)$$

В адсорбционной хроматографии V_S заменяют на площадь поверхности неподвижной фазы, и, следовательно,

$$K = k\beta \quad (9)$$

Коэффициент емкости k характеризует отношение между линейной скоростью u подвижной фазы и средней скоростью перемещения разделяемого вещества u_X . Из уравнений (2), (3) и (6) находим

$$u_X/u = 1/(k + 1) \quad (10)$$

Значение k может изменяться от нуля до бесконечности. Если $k=0$, то это означает, что $u_X=u$, т. е. компоненты разделяемой смеси не удерживаются в колонке. Если $k=\infty$, то $u_X=0$, а это означает, что компоненты необратимо абсорбируются неподвижной фазой и в выбранных условиях не элюируются.

Отношение коэффициентов емкости компонентов смеси 1 и 2 называют коэффициентом разделения α , или селективностью колонки:

$$\alpha = k_2/k_1 \quad (k_2 > k_1) \quad (11)$$

1.3. Разделение

Согласно рис. 1.1, разделение хроматографических пиков тем лучше, чем больше разность между временами удерживания двух следующих друг за другом веществ ($t_{R2}-t_{R1}$). С учетом уравнения (6) имеем

$$t_{R2}-t_{R1}=t_M(k_2-k_1) \quad (12)$$

Подставляя значение t_M из уравнения (2), получаем

$$t_{R2}-t_{R1}=(1/u)(k_2-k_1)l \quad (13)$$

Из этого уравнения следует, что разность между временами удерживания компонентов увеличивается пропорционально росту разности между их коэффициентами емкости и для данной объемной скорости пропорционально увеличению длины колонки l .

1.4. Дисперсия

1.4.1. Процесс размывания зоны

На описанный выше процесс разделения компонентов в хроматографической колонке отрицательно влияет размывание зон отдельных компонентов, обусловленное диффузионными процессами. Согласно рис. 1.2, эффект размывания характеризуется шириной пика у основания ω_b , которую определяют как отрезок, отсекаемый на нулевой линии двумя касательными, проведенными к пику, или шириной пика на высоте точек перегиба ω_i . Если хроматографический пик описывается кривой Гаусса, то

$$\omega_b=2\omega_i=4\sigma \quad (14)$$

где σ — величина стандартного отклонения, выражаемая в единицах длины, времени или объема [6] (кривая Гаусса в теории вероятностей описывает отклонения от среднего значения некоей величины, подверженной флуктуациям, в частности разброс ошибок измерения). Необходимо отметить, что графическое определение стандартного отклонения на хроматограмме возможно в том случае, если форма пиков соответствует истинно гауссовому распределению. На практике в большинстве случаев это условие не выполняется.

Ширина пика, как показывают и теория, и практика, увеличивается пропорционально корню квадратному из длины пути, пройденного веществом в колонке. Если какое-либо вещество полностью элюировалось из колонки, длина его пути равна длине колонки, т. е.

$$\sigma \approx \sqrt{l}; \sigma^2 \approx l \quad (15)$$

где σ^2 — дисперсия пика.

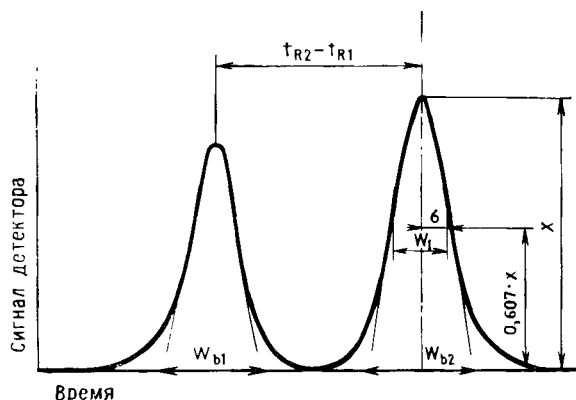


Рис. 1.2. Параметры, характеризующие разделение и размывание.

Вводя в соотношение (15) коэффициент пропорциональности h , получаем следующее выражение:

$$\sigma^2 = hl \quad (16)$$

Уравнения (13) и (16) отражают два основных хроматографических процесса — разделение и дисперсию (размывание) пиков. Оба эффекта усиливаются с увеличением длины колонки. Важнейшую роль в выявлении механизма хроматографических процессов, их описании и оптимизации имеет определение значений коэффициентов пропорциональности соответствующих зависимостей ($k_2 - k_1$) и h .

Параметр h в уравнении (16) отражает эффекты, приводящие к размыванию узкой зоны вещества при его перемещении вместе с подвижной фазой вдоль колонки. В результате усиливающихся дисперсии и разбавления элюируемое вещество выходит из колонки в виде более разбавленного раствора, чем раствор, подаваемый на колонку.

Мерой размывания полосы вещества в колонке является «высота, эквивалентная теоретической тарелке» (ВЭТТ). Этот термин, по-видимому, не совсем удачен и часто смущает студентов, так как у него очень мало общего с разделительными «тарелками» в дистилляционных колонках. Более приемлем в данном случае, по-видимому, термин «коэффициент дисперсии».

Однако в теории хроматографии понятие «теоретическая тарелка» играет очень важную роль. Предполагается, что математический эквивалент хроматографической колонки представляет собой колонку с тарелками, на каждой из которых достигается равновесное распределение разделяемого вещества между тарелкой и подвижной фазой. Число теоретических тарелок n пропорционально длине колонки:

$$n = l/h \quad (17)$$

Уравнение (17) характеризует эффективность колонки.

Любой хроматографический анализ следует проводить в таких условиях, чтобы при заданной длине колонки число теоретических тарелок было максимальным и, следовательно, высота теоретической тарелки была минимальной. Покажем на конкретном примере, какого прогресса достигла ВЭЖХ в последние 20 лет. В 1965 г. «хорошей» высотой теоретической тарелки в жидкостной хроматографии считалась высота не более 1 мм, тогда как в настоящее время h составляет 20 мкм и меньше, т. е. благодаря предпринятым усилиям высота теоретической тарелки уменьшилась в 50 раз.

Решая совместно уравнения (16) и (17), получаем

$$n = (l/\sigma_l)^2 = (t_R/\sigma_l)^2 \quad (18)$$

где σ_l и σ_t — величины дисперсии, выраженные в единицах длины и времени соответственно.

В теории хроматографии время удерживания определяют как время, в течение которого данное вещество находится в колонке. При определении времени удерживания из хроматограммы следует учитывать, что время между вводом пробы и получением соответствующего сигнала детектора складывается из истинного времени удерживания и времени, в течение которого вещество находится за пределами колонки, перемещаясь по коммуникациям, соединяющим колонку с детектором и системой ввода пробы. Таким образом, время, определенное из хроматограммы, отображенной на ленте самописца, больше, чем истинное время удерживания вещества. Величину дисперсии определяют по размыванию хроматографического пика. Число теоретических тарелок, рассчитанное из этих данных, называют «кажущимся числом тарелок», и обычно оно меньше числа теоретических тарелок.

В соответствии с уравнением (18) число теоретических тарелок n можно определить по веществу, не удерживаемому на колонке ($t_R = t_M$). Величина t_M имеет одинаковое значение для всех пиков на хроматограмме и, следовательно, не влияет на относительное время удерживания и разделение. Поэтому величину параметра, соответствующего n , но определенного по относительному времени удерживания t_R' , находят по выражению

$$N = (t_R'/\sigma_t)^2 \quad (19)$$

где N — число эффективных теоретических тарелок, а высоту, эквивалентную одной эффективной тарелке, H определяют следующим образом:

$$H = l/N \quad (20)$$

Решая совместно уравнения (18) и (19) и проводя соответствующую подстановку для коэффициента емкости (5), получаем уравнение, выражающее взаимосвязь между числом теоретических и числом эффективных теоретических тарелок:

$$N = n[k/(k+1)]^2 \quad (21)$$

Очевидно, что если $k=0$, то и $N=0$.

1.4.2. Уравнение Ван-Деемтера

Размывание хроматографических зон обусловлено в основном тремя следующими причинами:

а. Неоднородностью потока по сечению колонки, вследствие которой молекулы разделяемого вещества проходят пути различной длины. Влияние этого эффекта минимально, если колонка равномерно заполнена частицами малого диаметра с узким распределением частиц по размерам:

б. Продольной диффузией. Влияние этого вида диффузии в жидкостной хроматографии относительно мало, поскольку коэффициенты диффузии жидкостей невелики, и этот эффект становится ощутимым лишь в том случае, если вещество находится в колонке длительное время.

в. Диффузией и сопротивлением массопередаче молекул, перемещающихся из одной фазы в другую, и отклонением от состояния равновесия вследствие диффузии. Величина данного эффекта в значительной степени зависит от объемной скорости. Снижение объемной скорости и использование насадки с малым размером частиц и открытой пористой структурой (это снижает длину диффузионного пути) уменьшают влияние эффекта. Повышение температуры колонки также уменьшает сопротивление массопередаче, так как увеличивает коэффициенты диффузии и уменьшает вязкость.

Явлению размывания зон посвящено значительное число и теоретических, и экспериментальных работ. Факторы, вызывающие размывание зон, представляют собой индивидуальные независимые переменные, которые можно суммировать, чтобы получить полную картину:

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 = hl \quad (22)$$

Следовательно, высоту, эквивалентную теоретической тарелке, можно выразить следующим образом:

$$h = \sigma_1^2/l + \sigma_2^2/l + \sigma_3^2/l \quad (23)$$

Это известное уравнение Ван-Деемтера. Применительно к ВЭЖХ его записывают следующим образом:

$$h = A + B/u + Cu \quad (24)$$

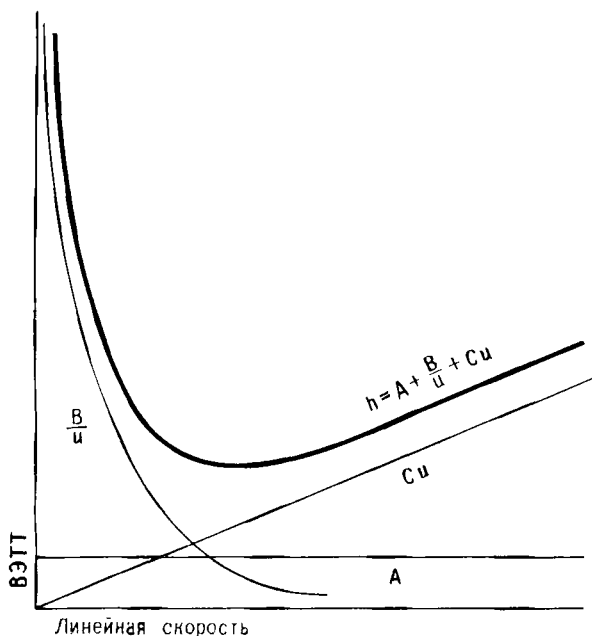


Рис. 1.3. Графическое изображение уравнения Ван-Деемтера и вкладов отдельных компонентов в размывание зон.

В несколько упрощенном виде константы уравнения (24) могут быть представлены как

$$A = 2\lambda dp; B = 2\gamma D_M; C = \omega dp^2/D_M$$

где dp — средний диаметр частиц; D_M — коэффициент диффузии в подвижной фазе; ω , λ — геометрические факторы; γ — коэффициент вихревой диффузии.

На рис. 1.3 показаны соответствующие уравнению Ван-Деемтера графики, выражающие зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от линейной скорости и вклад в суммарное уравнение отдельных его членов, характеризующих размывание хроматографической зоны. Кривая, демонстрирующая их суммарное влияние, показывает, что h зависит от объемной скорости и что минимальное значение h может быть достигнуто при примерно равных вкладах второго и третьего членов уравнения (24). К числу основных параметров, контролирующих высоту, эквивалентную теоретической тарелке, относятся: объемная скорость, диаметр частиц сорбента (длина диффузионного пути), характер заполнения колонки, геометрия заполнения и коэффициент диффузии. Эти параметры, называемые кинетическими, определяют положение кривой $h-u$ и ступенчатый вид правой ее ветви; они будут подробно рассмотрены в гл. 2.

1.5. Разрешение

Оптимизация хроматографического процесса в целом должна предусматривать как улучшение разделения компонентов смеси [в соответствии с уравнением (13)], так и уменьшение размывания зон [см. уравнения (16) и (24)]. Параметр, учитывающий оба эти требования, служит критерием достигнутой оптимизации хроматографического процесса. Его называют разрешением R_S и определяют как отношение расстояния между максимумами двух соседних пиков к среднему арифметическому их ширины по нулевой линии:

$$R_S = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (\omega_1 + \omega_2) \quad (25)$$

При полном разрешении пиков $R_S = 1$ (см. рис. 1.2). Для гауссовых пиков ($\omega = 4\sigma$) равной высоты с пренебрежимо малой разностью в их стандартных отклонениях ($\sigma_1 = \sigma_2$ или $\omega_1 = \omega_2$) уравнение (25) выглядит следующим образом:

$$R_S = (t_{R2} - t_{R1}) / 4\sigma_t \quad (26)$$

Подставляя в уравнение (26) выражения (12) и (18), получим

$$R_S = (1/4) (k_2 - k_1) / (k_2 + k_1) \sqrt{n} \quad (27)$$

чаем уравнение разрешения в окончательном его виде: (σ_t для пика 2 в единицах времени).

Преобразуя уравнение (27) с учетом уравнения (11), полу-

$$R = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1} \sqrt{n} \quad (28)$$

В это уравнение входят три переменные, определяющие основные требования к разрешению: разделяемые вещества должны удерживаться на неподвижной фазе, т. е. $k > 0$; удерживание разделяемых веществ должно различаться, т. е. $\alpha > 1$; хроматографическая колонка должна характеризоваться определенным числом теоретических тарелок.

При замене числа теоретических тарелок n в уравнении (28) на число эффективных теоретических тарелок N в соответствии с уравнением (21) имеем

$$R = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \sqrt{N} \quad (29)$$

Подбирая условия для проведения хроматографического разделения, этими тремя переменными, входящими в уравнение (28), вполне можно варьировать, но в определенных пределах. Улучшение разрешения путем увеличения коэффициента емкости имеет два следующих ограничения. Во-первых, как следует из уравнения (6), с ростом k увеличивается время удерживания и, следовательно, длительность анализа. Во-вторых, как показы-

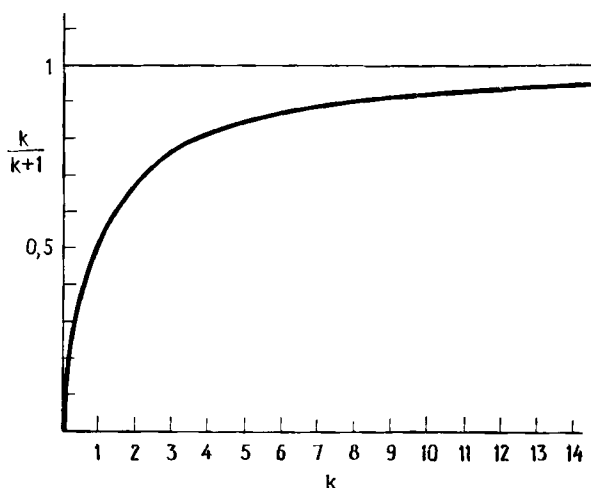


Рис. 1.4. Кривая зависимости члена уравнения (28) $k/(k+1)$ от k .

вает рис. 1.4, отношение $k/(k+1)$ очень скоро достигает своей предельной величины, равной единице. При $k > 5$ разрешение увеличивается очень слабо. На практике это означает, что необходимо выбирать такие условия разделения, чтобы коэффициент емкости находился в пределах от 1 до 5. Максимальное число эффективных теоретических тарелок в единицу времени достигается при $k=2$.

Ключевую роль в данной ситуации играет коэффициент разделения α , который необходимо предельно увеличить при помощи соответствующего выбора подвижной и неподвижной фаз и условий разделения. Примерно 50% публикуемых в последние годы работ в области ВЭЖХ посвящены именно этой проблеме. Важное достоинство жидкостной хроматографии состоит как раз в том, что коэффициент емкости и коэффициент разделения относительно несложно изменить путем изменения состава подвижной фазы (в этом и заключается основное преимущество жидкостной хроматографии перед газовой). Следует, однако, заметить, что многие соединения в условиях хроматографического разделения ведут себя аналогичным образом и, следовательно, характеризуются малыми значениями α и что разделение чрезвычайно сложных смесей близких по свойствам соединений приходится проводить довольно часто.

Согласно уравнению (28), число тарелок должно соответствовать некоторому определенному минимальному значению.

На рис. 1.5 приведена зависимость коэффициента разделения при $R_s=1$ и $k=1$ от числа теоретических тарелок. Как показывает эта зависимость, чтобы достичь значения $\alpha < 1,1$, необходимо использовать колонку с очень большим числом теоретических тарелок.

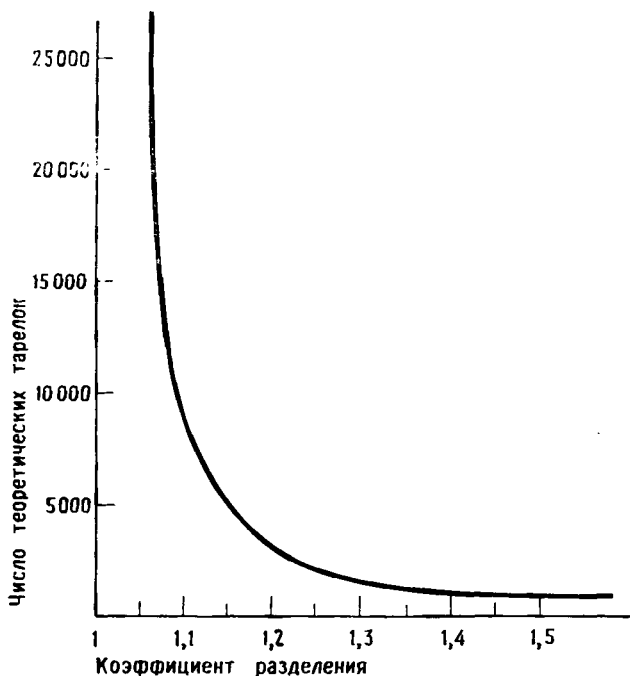


Рис. 1.5. Зависимость согласно уравнению (28) необходимого числа теоретических тарелок от коэффициента разделения при $R_S=1$ и $k=1$.

Проводя оптимизацию хроматографического разделения, в первую очередь необходимо подобрать такие условия, которые позволили бы получить высокие коэффициенты разделения, полностью исключаящие какие-либо взаимодействия между растворенными веществами и подвижной фазой. В различных видах жидкостной хроматографии на коэффициенты разделения и коэффициенты емкости влияют различные переменные. Все эти переменные, обычно называемые термодинамическими параметрами, подробно рассмотрены в гл. 2.

Чтобы не усложнять картину, мы рассматривали хроматограмму, содержащую всего два пика. Однако на практике приходится иметь дело с значительно большим числом пиков. В этом случае оптимизацию условий разделения следует проводить, исходя из такой пары компонентов, разделить которые наиболее трудно. Довольно часто при использовании одной подвижной фазы компоненты разделяемой смеси обнаруживают непомерно большой интервал времени удерживания. При этом те компоненты, которые элюируются первыми, разделяются плохо, а последние удерживаются в колонке чрезвычайно долго. В такой ситуации следует менять полярность подвижной фазы в ходе разделения с тем, чтобы коэффициенты емкости компонентов, элюируемых первыми, увеличились, а коэффици-

емкости компонентов, элюируемых позднее, уменьшились. Изменение полярности подвижной фазы осуществляют либо путем последовательной смены элюентов, либо путем изменения состава элюента в результате смешивания двух или более растворителей (по определенной программе). Такую методику элюирования называют градиентным элюированием (изменение состава проводят ступенчато или непрерывно), а элюирование элюентом одного и того же состава называют изократическим.

Литература

1. *Giddings J. C. Dynamics of chromatography, Part 1*, Dekker, New York, 1965.
2. *Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1974.
3. *Scott R. P. Contemporary Liquid Chromatography*, Wiley, New York, 1976.
4. *Am. Soc. Test. Mater. Publication, E 682* (1979).
5. *Ettre L. S. J. Chromatogr.*, **220**, 29 (1981).
6. *Said A. S. Theory and Mathematics of Chromatography*, Huethig, Heidelberg, 1981.
7. *van Deemter J. J., Zuiderweg F. J., Klinkenberg A. Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271 (1956).
8. *Moore S., Sparkman D. H., Stein W. H. Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958).
9. *Sparkman D. H., Stein W. H., Moore S. Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
10. *Horvath C., Preiss B., Lipsky S. R. Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).

Хроматографическая колонка

Х. Энгельгард, Х. Мюллер, У. Шён
(*H. Engelhardt, H. Müller, U. Schön*)

2.1. Механизм размывания зоны

2.1.1. Введение

Как указывалось в предыдущей главе, параллельно с хроматографическим разделением соединений, обусловленным их взаимодействием с неподвижной фазой, в процессе перемещения зон этих соединений по колонке происходит их размывание, или дисперсия [1—6]. Термодинамические подходы, используемые для описания процесса разделения, еще недостаточно развиты, поэтому объяснение происходящих эффектов в большей или меньшей степени носит описательный характер, причем оба конкурирующих процесса обсуждают независимо друг от друга. Разделение соединений возможно при наличии хорошей и эффективной колонки и при минимальном размывании (дисперсии) пиков.

2.1.2. Оптимизация работы колонки

Характеристикой колонки служит высота теоретической тарелки h или число теоретических тарелок n . Как было отмечено в гл. 1 (разд. 1.4), значение h зависит от диаметра частиц насадки, объемной скорости элюента, его вязкости, коэффициентов диффузии разделяемых соединений и качества заполнения колонки. Характер влияния этих факторов описывает уравнение Ван-Деемтера (гл. 1, разд. 1.4.2), которое можно также использовать и для оценки эффективности колонки [7].

Уравнение Ван-Деемтера в простейшей форме можно представить следующим образом [5, 8, 9]:

$$h = 2\lambda dp + \frac{2\gamma D_M}{u} + \omega \frac{dp^2}{D_M} u \quad (1)$$

Как показывает рис. 2.1, эффективность колонки и соответственно разрешение пиков увеличиваются с уменьшением диаметра частиц, заполняющих колонку.

В принципе зависимость h от размера частиц обусловлена двумя критериями: *вихревой диффузией* (параметр A в уравн. (24) гл. 1, первый член в уравнении (1) данной главы) и мас-

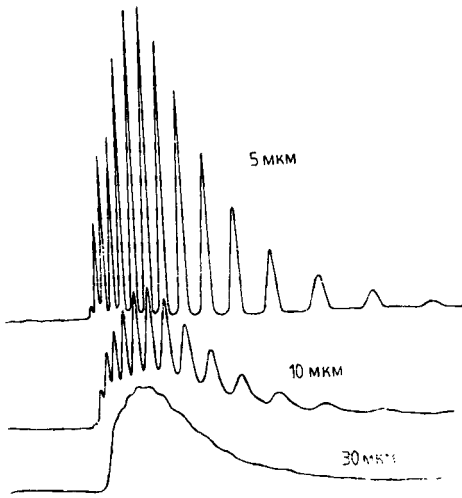


Рис. 2.1. Иллюстрация влияния размера частиц сорбента на эффективность колонки [10].
Неподвижная фаза: диоксорб Si60, размер частиц: 5, 10, 30 мкм; элюент: *n*-гептан/ТГФ (92/8); проба: полистирольные стандарты (мол. масса 600).

сопереносом (параметр C в уравнении (24), третий член в уравнении (1)). С помощью диффузионного критерия описывают размывание зоны, обусловленное различием в длине пути, который проходят разные молекулы разделяемого вещества вследствие явлений противотока и омывания потоком частиц насадки. Диффузионный критерий не зависит от объемной скорости элюента. Коэффициент λ , который, как правило, близок к 1, называют иногда фактором заполнения.

В теории хроматографии предполагают, что транспорт молекул вдоль колонки осуществляется только в результате перемещения элюента между частицами. Поры частиц заполнены неподвижным элюентом, и в них не происходит транспорта в осевом направлении колонки. Все растворенные в элюенте соединения, включая не удерживаемые на колонке, диффундируют в поры и из них и в результате отстают от фронта элюента. Обусловленное этим процессом размывание зоны характеризует параметр C , или третий член уравнения (1). На него оказывают влияние диаметр частиц, коэффициенты диффузии растворенных соединений в подвижной фазе и объемная скорость.

При очень низких скоростях потока на размывание полосы влияет также коэффициент продольной диффузии (параметр B в уравнении (24) гл. 1, второй член в уравнении (4) данной главы). В жидкостной хроматографии (ЖХ) его влиянием можно пренебречь, если, например, диаметр частиц равен 10 мкм, а линейная скорость превышает 2 мм/с. Величина коэффициента продольной диффузии зависит от величины коэффи-

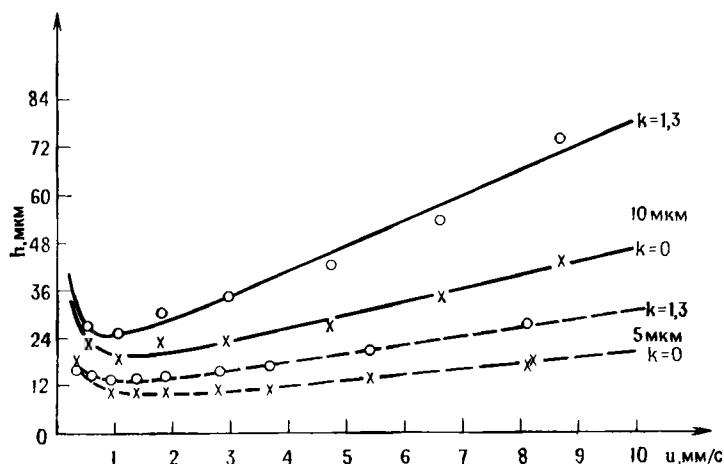


Рис. 2.2. Кривая Ван-Деемтера неподвижной фазы с частицами размером 5 и 10 мкм.

Неподвижная фаза: сферисорб SW; элюент: *n*-гептан, 30·10⁻⁴% воды; проба: C₂Cl₄ (*k*=0), пирен (*k*=1,3).

циентов диффузии разделяемых соединений в подвижной фазе, а также от вязкости элюента.

Очевидно, что эффективность колонки тем выше, чем меньше диаметр частиц. Большинство стандартных колонок длиной 25—30 см заполнены частицами диаметром 7—10 мкм, и число теоретических тарелок в них может достигать (5—10)·10³ (по неудерживаемому компоненту). Если колонки упакованы частицами меньшего диаметра (~5 мкм), то чтобы полностью использовать разделительную способность колонки, необходимо добиться минимально возможного влияния на уширение зон используемых приборов. Дальнейшее уменьшение диаметра частиц (менее 5 мкм) дополнительно увеличивает эффективность разделения, однако ограничивает ее эксплуатационные возможности вследствие увеличения перепада давления, нагревания за счет трения и т. д. [11, 12].

На рис. 2.2 в координатах уравнения Ван-Деемтера приведена зависимость h от u для колонок, заполненных частицами диаметром 10 и 5 мкм. Минимальное значение h (оптимальная производительность колонки) — функция диаметра частиц. Скорость, соответствующая оптимальному значению h ($u_{\min}$ при $h_{\min}$), возрастает с уменьшением размера частиц [13]. Из рис. 2.2 следует также, что чем больше h и чем больше параметр C (наклон восходящей ветви), тем больше время удерживания, что приводит к дополнительному размыванию зон вследствие массопереноса.

Этот эффект более ярко проявляется с увеличением коэффициента емкости k . При заданной объемной скорости наибольшие значения h характеризуют наиболее сильно удерживаемые соединения. Наклон восходящей ветви кривой (рис. 2.2) увеличивается также с уменьшением коэффициентов диффузии разделяемых веществ (при увеличении их молекулярной массы и (или) вязкости элюента). В то же время значение $u_{\min}$ уменьшается с увеличением молекулярной массы. Поэтому при разделении высокомолекулярных соединений при помощи эксклюзионной хроматографии линейная скорость должна быть небольшой.

Преимущества использования частиц малого диаметра более очевидны при скоростях, превышающих $u_{\min}$. В этих условиях параметр S имеет значительно меньшую величину как для неудариваемых, так и в большей степени для удерживаемых компонентов, что увеличивает эффективность разделения. Поэтому, если необходимо уменьшить время разделения, целесообразно использовать частицы наименьшего диаметра.

Иногда увеличение коэффициента емкости k сопровождается уменьшением h . В этом случае большую роль играет послеколоночное размывание пиков, поскольку мертвый объем послеколоночного участка по порядку величины равен объему пика. Поэтому оптимизация хроматографического разделения должна предусматривать снижение внеколоночного мертвого объема.

Перепад давления, необходимый для достижения заданной скорости, обратно пропорционален значению dp^2 , что ограничивает допустимое уменьшение размера частиц, особенно для длинных колонок и (или) высоких скоростей. Взаимосвязь давления и размера частиц описывает следующее уравнение:

$$B_0 = F\eta l / \pi r^2 \Delta P \quad (2)$$

где B_0 — проницаемость колонки, см^2 ; F — объемная скорость, мл/с ; l — длина колонки, см ; r — радиус колонки, см ; η — вязкость элюента, $\text{Па} \cdot \text{с}$ и ΔP — перепад давления, Па . Для определения B_0 необходимы лишь легко поддающиеся измерению параметры. Зависимость B_0 от диаметра частиц описывается уравнением

$$B_0 = dp^2 / \Psi \quad (3)$$

где Ψ — коэффициент сопротивления колонки, лежащий в пределах от 500 до 1000 [15, 16].

Для того чтобы приведенные зависимости были более понятны, сравним эффективности и скорости разделения на колонках, заполненных частицами диаметром 10, 5 и 3 мкм. Типичные экспериментальные данные, полученные для таких колонок, приведены в табл. 2.1. На колонке длиной 25 см, заполненной частицами диаметром 10 мкм, можно получить $\sim 10\,000$ тарелок.

Таблица 2.1. Эффективность разделения по методу ВЭЖХ на колонках, заполненных частицами размером 10, 5 и 3 мкм (обращенная фаза C_{18} , элюент: метанол)^а

d_p , мкм	u , мм/с	h , мкм		l , см	n		ΔP , бар	n/t , с ⁻¹		t , мин
		$k=0$	$k=3$		$k=0$	$k=3$		$k=0$	$k=3$	
10	1	20	30	25	12 500	8 330	8	12	8	17
				10	5 000	3 330	3,2			7
				3	1 500	1 000	1			2
5	1	15	16	25	16 670	15 625	32	16	15	17
				10	6 670	6 250	12,8			7
				3	2 000	1 875	3,8			2
3	2	11	10	25	22 730	25 000	180	45	50	8,5
				10	9 090	10 000	71			3,5
				3	2 730	3 000	21			1

^а d_p — размер частиц, u — линейная скорость, h — высота, эквивалентная теоретической тарелке, l — длина колонки, n — число теоретических тарелок, ΔP — перепад давления, n/t — скорость разделения, t — длительность разделения.

Такое же число тарелок можно получить на колонке длиной 10 см с частицами размером 3 мкм. Однако длительность разделения при этом для $k=3$ снижается с 17 до 3,5 мин. Таким образом, основное достоинство колонок, заполненных частицами малого диаметра, — высокая скорость разделения. Для частиц диаметром 3 мкм эта величина составляет порядка 50 тарелок/с. Табл. 2.1 показывает также, что для короткой колонки, заполненной мелкими частицами (3 мкм), значение h уменьшается с увеличением k из-за особенностей хроматографического оборудования (объемов дозирующей петли, коммуникаций, ячейки детектора, мертвого времени детектора и самописца).

Для большинства задач, выполняемых методом ВЭЖХ, достаточно 3000 теоретических тарелок. В приведенном примере это значение было достигнуто для $k=3$ на 10-см колонке, заполненной частицами диаметром 10 мкм. Длительность разделения при этом составляет 7 мин, необходимый перепад давления равен 0,32 МПа. Такое число теоретических тарелок можно получить на 5-см колонке при диаметре частиц 5 мкм (время разделения 4 мин, перепад давления 0,7 МПа). Для частиц диаметром 3 мкм длина колонки может равняться всего 3 см (1 мин, 2,1 МПа). Однако ширина пика при $k=3$ составляет всего 4,4 с, поэтому для обнаружения необходимы безынерционные детектор и самописец [17]. С уменьшением ширины пика его высота увеличивается, соответственно увеличивается и чувствительность обнаружения. Поэтому анализ микроколичеств

целесообразно проводить на очень коротких колонках, заполненных частицами малого диаметра, обеспечивающих необходимое для разделения число тарелок. Следует отметить, что использование длинных колонок, заполненных очень мелкими частицами, приводит к нежелательным градиентам вязкости и температуры внутри колонки, влияющим на форму пиков и время удерживания [18].

Сравнение достоинств и недостатков частиц правильной сферической и неправильной форм [6, 19—21] показало, что форма частиц не оказывает существенного влияния на эффективность колонки, между тем стоимость сферических частиц существенно выше [20, 21]. Однако проницаемость колонок, заполненных сферическими частицами, несколько лучше. Если разделение проводят при незначительной высоте, эквивалентной теоретической тарелке, и небольших скоростях [5], то для описания процесса достаточно одного уравнения (одной кривой) для разных элюентов и частиц разного диаметра [22—24]. Это же уравнение позволяет сделать выводы, касающиеся оптимального размера частиц, минимальной объемной скорости и эффективности колонки, которые обсуждались выше.

2.1.3. Оценка эффективности колонки

Итак, как следует из сказанного выше, чтобы разделение прошло успешно, необходима «хорошая» колонка. Эффективность колонки зависит от диаметра частиц, распределения частиц по размеру и степени однородности ее заполнения. Заполнение колонок в подавляющем большинстве случаев проводят суспензионным методом. Самостоятельное заполнение колонок (и получение воспроизводимых результатов) требует опыта, навыков и соответствующего оборудования. В настоящее время большинство типов материалов, используемых для заполнения колонок, характеризуются достаточно узким распределением частиц по диаметрам. Различные методы заполнения колонок рассмотрены в работах [1, 2, 25].

Ниже будет описан простой метод определения сопротивления и эффективности колонки на основе данных о диаметре частиц (в методе применяют легко измеряемые параметры [2, 7]). Одновременно с оценкой колонки проверяют и другое хроматографическое оборудование. Испытания следует проводить с легкодоступными соединениями и чистыми растворителями. Обычно для оценки колонок с обращенной фазой или силикагелем выбирают метанол или дихлорметан соответственно. Коэффициенты емкости соединений, выбираемых для оценочных испытаний, должны лежать в интервале от нуля (инертные соединения) до трех. Для обращенно-фазовой системы и метанола можно рекомендовать смесь многоядерных аромати-

ческих углеводов, для силикагеля и дихлорметана — монозамещенные производные бензола.

Наличие несимметричных пиков особенно неудерживаемых или слабо удерживаемых соединений ($k < 2$) характерно для плохо заполненной колонки (если наличие каких-либо дефектов оборудования исключено). Если одно и то же соединение дает двойные пики, то чаще всего это обусловлено тем, что вверху колонки имеется полость. Иногда, чтобы исправить положение, достаточно добавить в колонку дополнительное количество упаковочного материала. Асимметрия пиков удерживаемых соединений при симметричном пике инертного соединения обусловлена нелинейностью изотермы адсорбции и (или) перегрузкой колонки. В таких случаях получить симметричные пики часто удается путем уменьшения объема (массы) пробы.

Асимметричность пика определяют, проводя перпендикуляр из точки максимума к нулевой линии и рассчитывая соотношение расстояний от этого перпендикуляра до сторон пика на расстоянии 10% его высоты от основания. Если коэффициент асимметричности A_s превышает 1,5, то качество заполнения колонки рассматривается как неудовлетворительное.

Эффективный диаметр частиц внутри колонки не всегда соответствует тому, что указывает изготовитель. Кроме того, «старение» колонки приводит к гораздо большему перепаду давления, чем можно было бы ожидать, исходя из указанного диаметра частиц.

Корреляцию между диаметром частиц, длиной колонки, объемной скоростью, перепадом давления и проницаемостью колонки устанавливает следующее уравнение:

$$dp = 23\sqrt{F\eta l/r^2\Delta P} \quad (4)$$

где dp имеет размерность мкм, F — мл/мин, l — см, η — сПз, r — мм, ΔP — бар, 23 — численный коэффициент, предназначенный для перевода в СИ.

Линейную скорость определяют по выходу инертного соединения. В табл. 2.2 приведены некоторые данные, позволяющие выбрать подходящие инертные соединения для различных видов хроматографии. Проблема определения мертвого времени для обращенно-фазовой хроматографии подробно обсуждена в разд. 2.2.4.2. Среднюю линейную скорость рассчитывают, исходя из t_m и длины колонки.

Расчет теоретически возможной высоты, эквивалентной теоретической тарелке, проводят на основании эффективного размера частиц (вычисленного из уравнения (4)):

$$h = 2dp + 6/u + (dp^2/20)u \quad (5)$$

Величина h служит мерой эффективности колонки.

Таблица 2.2. Инертные соединения, используемые в хроматографии на силикагеле и на обращенных фазах

Неподвижная фаза	Силикагель		Обращенная фаза			
	Элюент					
Инертное вещество (метод обнаружения) ^a	<i>n</i> -C ₇ H ₁₆	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	CH ₃ OH	CH ₃ CN	CH ₂ Cl ₂
	<i>n</i> -C ₆ H ₁₄ (P ^a)	CD ₂ Cl ₂ (P)	D ₂ O (P)	CD ₃ OH (P)	CD ₃ CN (P)	CD ₂ Cl ₂ (P)
		CHCl ₃ (P)				CHCl ₃ (P)
	C ₂ Cl ₄ (УФ, P)	C ₂ Cl ₄ (УФ, P)		CH ₃ NO ₂ (УФ, P)	CH ₃ NO ₂ (УФ, P)	C ₂ Cl ₄ (УФ, P)
		CCl ₄ (УФ, P)				CCl ₄ (УФ, P)
		C ₆ H ₆ (УФ, P)				C ₆ H ₆ (УФ, P)
			D ₂ O/CH ₃ OH (P)	D ₂ O/CH ₃ CN (P)		
			Смеси с элюентом			

^a P — рефрактометрическое обнаружение, УФ — спектрофотометрическое в УФ-диапазоне.

Уравнение (5), которое представляет собой упрощенную форму уравнения (1), позволяет определить h в мкм, а dp и u — в мкм и мм/с соответственно. С помощью уравнения (1) нельзя вычислить значения индивидуальных параметров в уравнении Ван-Деемтера. При линейной скорости около 1 мм/с (u_{min} для частиц диаметром 5—10 мкм) оптимальное значение h соответствует примерно $3dp$. Если h превышает это значение вдвое, качество заполнения колонки можно считать приемлемым только при условии симметричности пиков. Сказанное выше справедливо только при условии, что разделяемые соединения имеют низкую молекулярную массу, а элюент — небольшую вязкость (уравнение (5) справедливо для коэффициента диффузии около $3,5 \cdot 10^{-5}$ см²/с). Если эти условия не выполняются, h принимает более высокое значение. Вторичные механизмы удерживания, например лигандный обмен, могут вызывать дополнительное размывание пиков.

2.2. Механизм удерживания

2.2.1. Введение

Возможность разделения двух соединений обусловлена различием в свободной энергии их сорбции в хроматографической системе (неподвижная фаза и элюент). Чем больше это различие, тем легче достигнуть разделения этих двух соединений и тем меньшее число тарелок для этого необходимо. Поставщики, как правило, определяют эффективность колонок для элюентов с низкой вязкостью и соединений с небольшой молекулярной массой, что не соответствует условиям биохимического применения ВЭЖХ.

В принципе приемы классических методов разделения — жидкостной хроматографии низкого давления — применимы и в высокоэффективной хроматографии, если неподвижные фазы идентичны и выдерживают повышенное давление, а элюент удовлетворяет условиям обнаружения. Использование химически привитых фаз расширяет возможности ВЭЖХ, делая ее пригодной для разделения водорастворимых соединений. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняют на химически привитых фазах, главным образом фазах с привитыми алкильными группами (обращенных фаз). Методы гель-проникающей хроматографии, осуществляемой на механически непрочных сорбентах типа сефадекса и др., не применимы в ВЭЖХ. Однако силикагель можно получать в виде частиц с различным распределением пор по диаметру, и после соответствующей химической модификации его можно использовать в высокоэффективной гель-эксклюзионной хроматографии высокого разрешения. Ионообменное хроматографическое разделение осуществляется на механически прочных смолах и ионообменниках на основе силикагеля.

Схематическая дифференциация по механизмам сорбции разделяемых веществ дает только общую картину процесса разделения. Удерживание компонентов биологических проб может быть обусловлено несколькими механизмами. Однако взаимодействие между поверхностью неподвижной фазы возможно только в том случае, если разделяемые соединения способны проникать в поры неподвижной фазы и имеют доступ к ее поверхности. Для сферических частиц (10 мкм) на долю внешней, геометрической, поверхности приходится менее 1% их общей поверхности. Неоднородность поверхности, возможная даже у химически привитых фаз, оказывает заметное влияние на удерживание, например в обращенно-фазовой хроматографии оставшиеся немодифицированными силанольные группы вызывают разделение по ионообменному и ион-эксклюзионному механизмам. Изменение состава элюента в различной степени

влияет на разные механизмы разделения, поэтому для получения воспроизводимых хроматографических результатов необходимы данные о механизме разделения и их относительной роли, а также о влиянии на них состава элюента.

Выбирая условия разделения, следует исходить из его цели. Одна из возможных целей хроматографического разделения — это определение состава смеси, т. е. разделение и качественная и количественная идентификация компонентов смеси. В этом случае следует использовать систему с приемлемым разрешением, хорошей воспроизводимостью и точностью. Если имеются соответствующие стандарты, оптимизацию системы провести несложно. В этом случае допустимы даже такие хроматографические условия, которые приводят к деструкции разделяемых соединений. Вторая цель хроматографического разделения — препаративное разделение, оптимизировать условия которого более сложно, особенно с учетом того, что в процессе разделения необходимо сохранить биологическую активность разделяемых соединений. Наложение различных механизмов разделения часто приводит к плохому разделению компонентов смеси и плохому их выходу. Сорбционные процессы могут иногда вызывать изменения структуры разделяемых веществ, поэтому для препаративного разделения предпочтительна гель-эксклюзионная хроматография. Однако, чтобы выход разделяемых соединений был высоким, возможность вторичных взаимодействий следует свести до минимума.

2.2.2. Характеристики силикагеля

В классической колоночной жидкостной хроматографии в качестве неподвижных фаз широкое распространение получили оксид алюминия и силикагель. С появлением ВЭЖХ силикагель стал основной неподвижной фазой; в этом виде хроматографии он применяется и как таковой, и как носитель химически привитых фаз. На рис. 2.3 показаны возможные варианты использования силикагеля. При обсуждении механизма удерживания на неподвижных фазах с химически привитыми функциональными группами в первую очередь принимают во внимание свойства именно этих групп, однако не учитывать свойства силикагеля-носителя было бы ошибкой. Поэтому в данном разделе свойства силикагеля будут обсуждены прежде, чем отдельные методики разделения.

Выпускаемые промышленным способом силикагели различаются по своим физическим свойствам, а именно по удельной поверхности, среднему диаметру и удельному объему пор. Эти три характеристики связаны следующим уравнением (для цилиндрических пор):

$$\varphi = (4V_p/v_{sp}) \cdot 10^3 \quad (6)$$

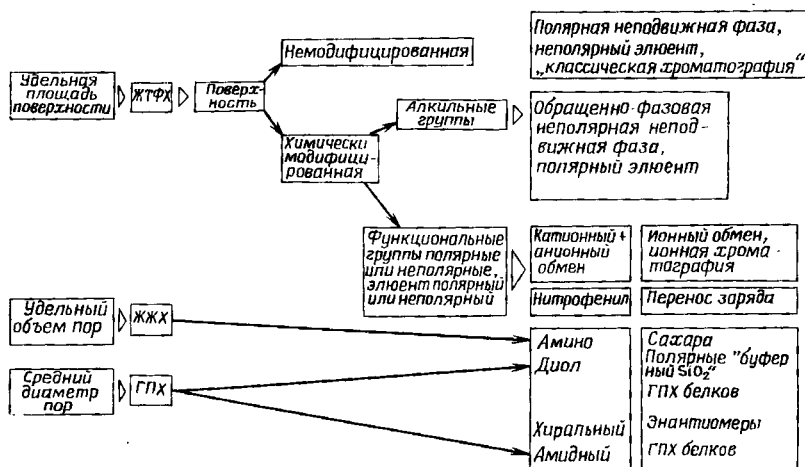


Рис. 2.3. Пористые неподвижные фазы на основе силикагеля.

где ϕ — средний диаметр пор, нм; V_p — удельный объем пор, мл/г; v_{sp} — удельная поверхность, м²/г [26]. Увеличение удельной поверхности при постоянном объеме пор приводит к уменьшению их диаметра.

В ВЭЖХ используются силикагели с удельной поверхностью примерно 300 м²/г, средним диаметром пор 10 нм и удельным объемом пор около 1 мл/г. Силикагели со средним диаметром пор менее 5 нм пригодны для разделения соединений с молекулярной массой менее 5000. В этом случае для разделения доступно около 80% общего объема пор. Если такие силикагели используют в гель-эксклюзионной хроматографии, верхний предел исключения составляет 200 000 (беспорядочные цепи) [27]. Эти характеристики силикагелей сравнимы лишь в том случае, если силикагели получены по одной и той же методике.

В хроматографии более важными характеристиками являются площадь поверхности или объем пор, приходящиеся на единицу объема колонки. Силикагели, приготовленные специально для ВЭЖХ (например, силикагели со сферическими частицами), имеют большую плотность, чем силикагели, полученные полимеризацией кремниевой кислоты [28, 29]; упаковочная плотность этих материалов составляет 0,6 и 0,35 г/мл соответственно. Свойства некоторых коммерческих силикагелей, используемых в ВЭЖХ как таковые или в виде носителей химических привитых фаз, приведены в табл. 2.3.

Удерживание малых молекул на двух материалах с одинаковой удельной поверхностью (300 м²/г), например на лихросорбе Si 100 и зорбаксе Si1 при одинаковом составе элюента, может существенно отличаться. Если обе колонки заполнены в

Таблица 2.3. Свойства некоторых силикагелей

Силикагель	Удельная поверхность, м ² /г	Диаметр пор, нм	Удельный объем пор, мл/г	Пористость	Плотность упаковки, г/мл	pH ^а	Форма ^б частиц
Эуросорб	400	9	1,0	0,84	0,35	6,7	н
Гилерсил	180	11	1,1	0,78	0,53	9,0	с
Лихросорб Si 100	320	10	1,0	0,83	0,34	7,0	п
Лихросфер Si 100	250	10	1,2	0,84	0,35	5,5	с
Лихросфер Si 500	60	27	0,8	0,85	0,38	9,9	с
Нуклеосил 100	300	10	1,0	0,82	0,34	5,7	с
Партисил	400	9	0,9	0,84	0,35	7,5	н
Полигосил 60	500	6	0,8	0,83	0,37	8,0	н
Порасил	350	10	1,1	0,86	0,37	7,2	н
Сервахром Si 100	300	10	1,2	0,84	0,34	6,7	н
Сферисорб SW	220	8	0,6	0,77	0,61	9,5	с
Зорбакс BP-Sil	300	6	0,5	0,71	0,60	3,9	с

^а В 5%-ной водной суспензии. ^б н — неправильная, с — сферическая.

идентичных условиях, колонка с зорбаксом имеет более высокий коэффициент емкости вследствие большей плотности упаковки зорбакса.

Увеличение плотности упаковки колонки с 0,34 до 0,60 г/мл приводит к уменьшению объема, занимаемого в колонке элюентом. Общая пористость ε_T уменьшается с 0,83 до 0,71. При стандартизации параметров сорбции этим уменьшением объема элюента пренебрегать нельзя [30].

Обычно принято считать, что поверхность силикагеля обладает кислотными свойствами [28, 29]. pH 5%-ной (по объему) суспензии «чистого» силикагеля равен 4—5. У суспензий силикагелей с частицами неправильной формы pH принимает почти нейтральное значение, тогда как у суспензий силикагелей со сферическими частицами pH превышает 8 из-за наличия примесей, попавших в процессе приготовления [30]. Очевидно, что различия в значениях pH на поверхности силикагелей влияют на селективность привитых фаз в полярных водных элюентах. Однако, как это ни странно, даже при использовании неполярных элюентов незначительное изменение pH поверхности оказывает сильное влияние на удерживание веществ и эффективность колонки (на рис. 2.4 это показано на примере разделения ароматических аминов при элюировании дихлорметаном). Это явление может помочь открыть новые подходы к оптимизации процесса разделения соединений с основными или кислотными свойствами как при помощи адсорбционной хроматографии

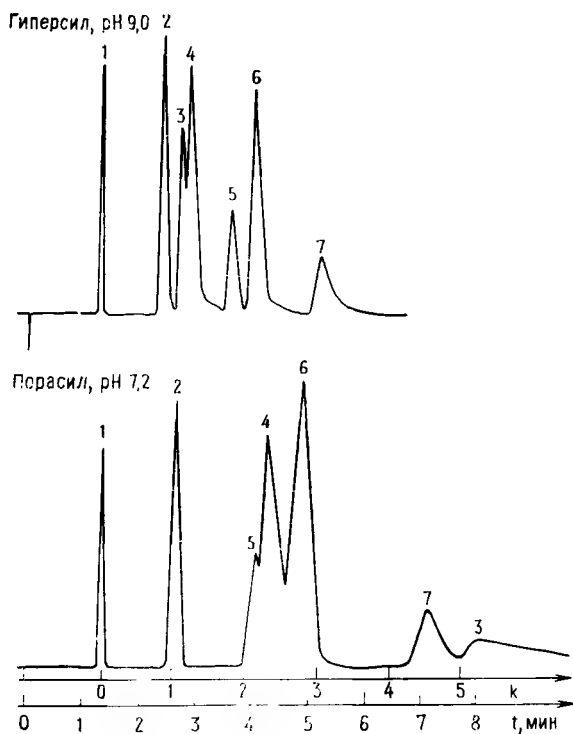


Рис. 2.4. Разделение ароматических аминов на «основном» и «нейтральном» силикагеле при элюировании неполярным элюентом [30].

Элюент: дихлорметан; проба: 1 — бензол, 2 — о-нитроанилин, 3 — N,N-диметиламин, 4 — N-метиламин, 5 — п-нитроанилин, 6 — м-нитроанилин, 7 — анилин.

[31], так и при разделении на химически привитых фазах [17, 32].

Силикагели или привитые фазы на основе силикагелей стабильны в водных растворах в интервале рН 2—8 [28, 29]. При других значениях рН силикагель растворяется или привитые группы гидролизуются. При комнатной температуре и элюировании водными элюентами с нейтральным значением рН в условиях длительной эксплуатации отмечают изменение коэффициента емкости, обусловленное, по-видимому, гидролизом. Растворимость силикагеля в воде незначительна и при комнатной температуре составляет 10^{-2} мг/мл [28]. Это позволяет насыщать колонки элюентом до ввода проб. При проведении биохимических анализов обычно рекомендуется устанавливать перед аналитической колонкой предколонку с целью удаления из пробы полимерных нерастворимых или коллоидных частиц. Предколонка защищает аналитическую колонку и увеличивает время жизни последней.

Диаметр пор стандартного силикагеля можно увеличить при помощи гидротермальной обработки [28, 29]. Таким методом обрабатывают готовые силикагели, например предназначенные

для разделения полимеров методом адсорбционной или эксклюзионной хроматографии. Свойства одного из таких силикагелей (лихросфера Si 500) приведены в табл. 2.3, а возможности применения в качестве неподвижной фазы подробно обсуждены в разд. 2.2.8. Необходимо отметить, что высокотемпературная обработка силикагеля в присутствии воды или спиртов, например высушивание увлажненного водой силикагеля при повышенной температуре, может приводить к изменению его пористой структуры и, как правило, уменьшает его удельную поверхность [29].

На химическую природу поверхности силикагеля оказывают влияние поверхностные силанольные ($\equiv\text{Si}-\text{OH}$) и силоксановые ($\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$) группы. Первые в основном ответственны за сорбционные процессы или реакции с силанами. Экспериментально и теоретически установлено, что поверхностная концентрация силанольных групп составляет $7-8$ мкмоль/м² [28]. Поэтому можно предположить, что среднее расстояние между силанольными группами равно $0,4-0,5$ нм. Высушивание силикагеля при температурах ниже 150°C приводит к удалению только физически адсорбированной воды, а при температурах выше 200°C удаляется вода, химически включенная в структуру силикагеля. Это сопровождается уменьшением поверхностной концентрации силанольных групп и служит причиной изменения хроматографических свойств силикагелей.

2.2.3. Разделение на силикагеле

В адсорбционной хроматографии силикагель используют в качестве полярной неподвижной фазы в сочетании с неполярными УФ-прозрачными элюентами, например алифатическими углеводородами или дихлорметаном, в которые добавляют спирты, диоксан или тетрагидрофуран. Соединения, не поддающиеся разделению в таких системах, следует разделять при помощи обращенно-фазовой хроматографии, когда неподвижная фаза неполярна, а подвижная — сильнополярна (например, водные растворы ацетонитрила или метанола). Поскольку классическая адсорбционная хроматография применяется в биохимии очень мало, данный метод будет рассмотрен лишь кратко. Как и в любой другой хроматографической системе, в этом случае трудно выявить влияние отдельных характеристик процесса на разделение. Поэтому хроматографическую среду, взаимодействие растворенных соединений, растворителя и неподвижной фазы приходится учитывать в совокупности. Тем не менее, чтобы упростить описание системы разделения, каждый из параметров, например неподвижная фаза, полярность растворителя и структура растворенного соединения, и его влияние на разделение будут рассмотрены отдельно.

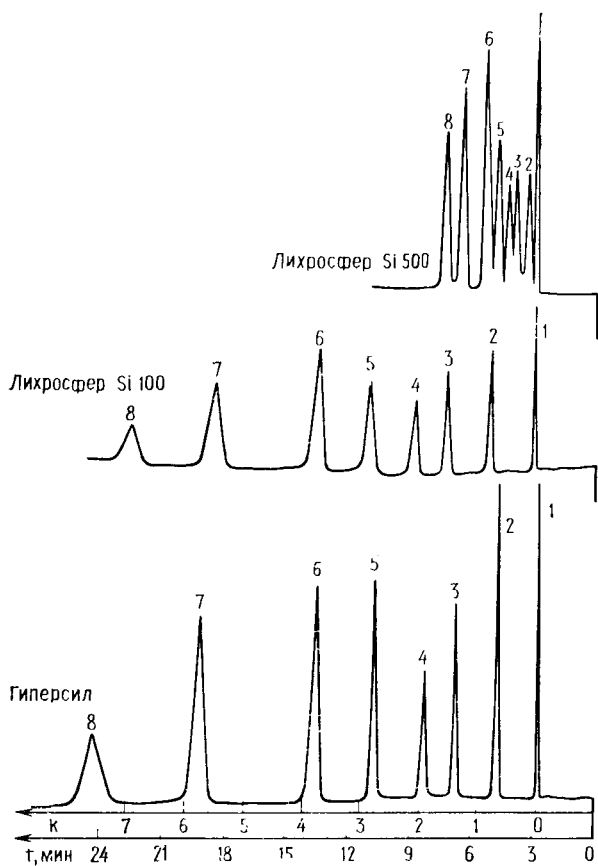


Рис. 2.5. Влияние удельной площади поверхности и плотности упаковки силикагеля на удерживание [31]

Элюент: *n*-гептан; проба: 1 — C_2Cl_4 , 2 — бензол, 3 — нафталин, 4 — ацнафтен, 5 — антрацен, 6 — фторантен, 7 — хризен, 8 — 3,4-бензофторантен.

2.2.3.1. Влияние свойств силикагеля. Как отмечалось выше, за удерживание веществ на колонке ответственны главным образом поверхностные силанольные группы, и поскольку они обладают кислотными свойствами, соединения основного характера удерживаются прочнее, чем кислотные или нейтральные. Удерживание усиливается с увеличением поверхности сорбента, приходящейся на единицу объема колонки. На рис. 2.5 показано разделение ароматических углеводородов на силикагелях с разной удельной поверхностью.

На силикагелях лихросфер Si 100 и гиперсил достигается одинаковое разделение, хотя удельные поверхности их различны. Более высокая плотность заполнения гиперсилом компенсирует его меньшую удельную поверхность. Наиболее быстрое разделение при удовлетворительном разрешении достигается на силикагеле с наименьшей удельной поверхностью (лихросфе-

ре Si 500). Поскольку свойства разных силикагелей различаются (см. табл. 2.3), сравнение удерживающей способности можно проводить только при условии стандартизации коэффициентов емкости при различных величинах удельной поверхности (v_{sp}), плотности упаковки (ρ) и объемной доли элюента (ϵ_T) в колонке [31]:

$$K^* = k(\epsilon_T / v_{sp} \rho) \quad (7)$$

Если химические свойства поверхности силикагелей идентичны, то «константы адсорбции» (K^*) должны быть одинаковы. В свою очередь если K^* различаются, то химические свойства поверхности и особенно pH также различаются (см. рис. 2.4, разд. 2.2.2).

2.2.3.2. Влияние элюента. Элюотропные ряды. Выбор элюента, как правило, в более значительной степени влияет на разделение, чем выбор неподвижной фазы. Существует правило: чем прочнее элюент адсорбируется на неподвижной фазе, тем больше его элюирующая способность. Молекулы элюента и растворенных в нем соединений конкурируют за адсорбционные центры на поверхности силикагеля [33]. Вследствие большого избытка элюента конкуренция происходит всегда, и поэтому элюирование полярных соединений можно проводить даже относительно слабополярными элюентами. В классической адсорбционной хроматографии органические растворители классифицируют по их элюирующей способности ϵ_0 и располагают в так называемые элюотропные ряды [33]. Большинство органических растворителей, входящих в эти ряды, неприемлемы для ВЭЖХ, в которой используются фотометрические детекторы. *n*-Алканы по элюирующей способности практически не отличаются от изоалканов, однако более предпочтительны в качестве элюентов, поскольку имеют меньшую вязкость. Дихлорметан и в меньшей степени хлороформ используют как компоненты полярных элюентов. Элюирующую способность увеличивают путем добавления спиртов, эфиров и ацетонитрила. Поскольку эти растворители значительно отличаются по элюирующей способности от алканов и дихлорметана, добавление даже небольших их количеств сильно меняет общую элюирующую способность. Изменение состава элюента даже в пределах одного процента может критическим образом изменить его элюирующую способность. Приготавливать смеси таких элюентов строго воспроизводимого состава очень сложно, кроме того, их состав может изменяться при хранении (испарение одного из компонентов), поэтому адсорбционная хроматография имеет репутацию метода с плохой воспроизводимостью.

Смеси растворителей, обладающие одинаковой элюирующей способностью, можно приготовить или путем смешения больших

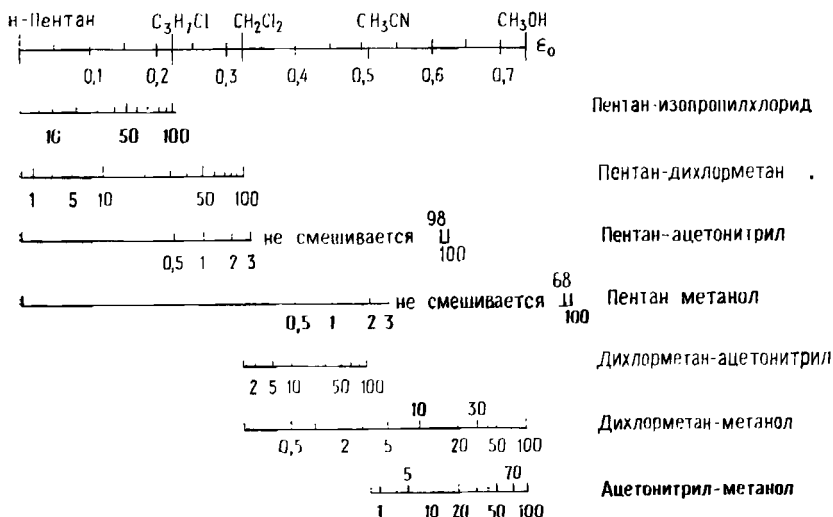


Рис. 2.6. Элюирующая способность смесей растворителей.

количеств растворителей с близкой элюирующей способностью, или путем добавления очень небольшого количества растворителя с высокой элюирующей способностью к основному неполярному компоненту элюента. На рис. 2.6 приведена схема, позволяющая сравнивать элюирующую способность смесей растворителей. Например, элюирующая способность смеси пентана и дихлорметана (1:1) соответствует таковой для 1%-ного раствора ацетонитрила в пентане или примерно 0,3%-ного раствора метанола в пентане. Приведенная на рис. 2.6 схема лишь приблизительно отражает изменение элюирующей способности смесей растворителей. Окончательный выбор состава элюента должен быть проведен более тщательно, с тем чтобы была достигнута необходимая величина k . Изменение элюирующей способности на 0,05 (по шкале на рис. 2.6) приводит к 3—4-кратному изменению коэффициента емкости, поскольку k зависит от элюирующей способности по логарифмическому закону. Однако не следует удивляться тому, что селективность разделения при использовании элюентов, содержащих эквивалентные объемы пентана и дихлорметана или пентана и 1% ацетонитрила, может различаться. Селективность разделения при элюировании смесью сильно отличающихся по полярности растворителей обычно бывает лучше, тогда как воспроизводимость результатов лучше при элюировании смесью с эквивалентным по объему соотношением компонентов.

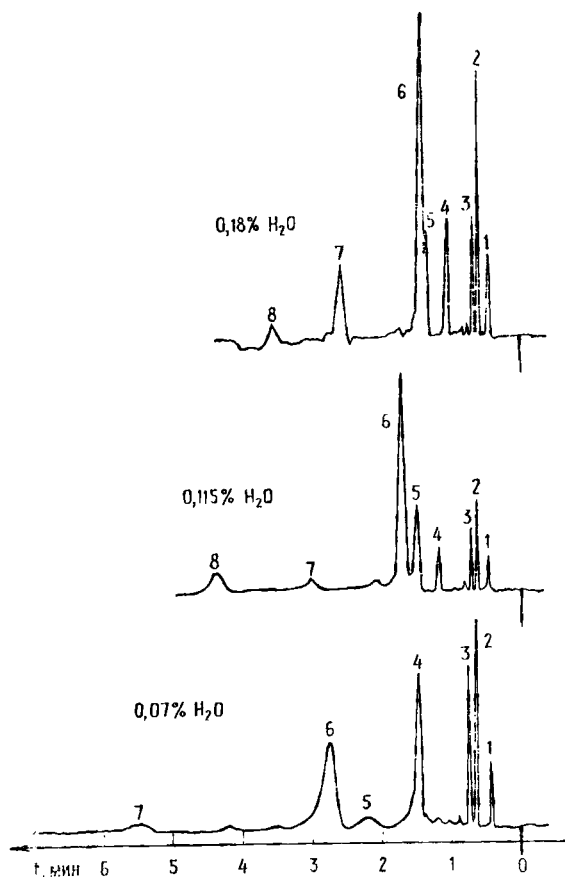


Рис. 2.7. Влияние концентрации воды в элюенте на разделение стероидов [34].

Неподвижная фаза: сферисорб; элюент: дихлорметан с контролируемым содержанием воды; проба: 1 — инертное соединение; 2 — холестерин, 3 — прогестерон, 4 — 17-метилгестостерон, 5 — эстерон, 6 — 17-гидроксипрогестерон, 7 — эстрадиол, 8 — преднизолон.

2.2.3.3. Влияние воды. Добавление полярных соединений в элюент сильно влияет на удерживание и селективность, даже если концентрации таких добавок очень малы: например, на уровне растворимости воды в *n*-гептане ($<10^{-2}\%$) или в дихлорметане ($<0,2\%$). Столь небольшие изменения состава элюента, трудно поддающиеся определению и контролю, оказывают влияние на удерживание и селективность. В работе [34] описана система контроля за содержанием влаги в потоке, предназначенная для определения содержания влаги в элюенте, контроля содержания и поддержания его на требуемом уровне. Влияние влаги особенно сильно выражено для неполярных элюентов, а по мере увеличения полярности (увеличения растворимости воды в элюенте) оно сказывается все слабее. Содержание воды в дихлорметане определяют титрованием по методу Карла-Фишера. Добавки воды в пределах нескольких $10^{-4}\%$

не оказывают влияния на абсолютное и относительное удержание. Рис. 2.7 иллюстрирует влияние концентрации воды в дихлорметане на разделение стероидов. В зависимости от поставленной перед аналитиком задачи оптимальное разделение можно получить при высоком или низком содержании воды. Чтобы избежать проблем, связанных с использованием воды, рекомендуется заменить воду на метанол или другие спирты. Однако приготовление и хранение таких элюентов сопряжено с определенными трудностями (например, испарение спирта), причем влиянием содержания воды на результаты разделения нельзя пренебречь и в этом случае [35]. Следует учитывать, что, если результаты разделения зависят от содержания в элюенте воды или спирта, селективность может существенно различаться, даже если коэффициенты емкости в обоих случаях одинаковы.

2.2.3.4. Распределение. Для нанесения на активный носитель различных количеств неподвижной жидкой фазы можно воспользоваться следующим приемом: дать уравновеситься концентрациям полярного соединения, например воды или спирта, растворенного в элюенте и адсорбированного на полярной неподвижной фазе. В результате колонка, заполненная активным носителем, будет трансформирована в колонку для распределительной хроматографии. Для получения распределительных хроматографических систем необходимы высокие концентрации полярных добавок. Это единственный способ, позволяющий нанести необходимое количество неподвижной жидкой фазы на полярное твердое вещество *in situ* в уже упакованных колонках [36, 37].

Для получения распределительных систем с полярными твердыми фазами рекомендуются тройные смеси растворителей [38], состоящие из неполярного элюента (например, гептана или дихлорметана), сильнополярного компонента (обычно воды) и низкомолекулярного спирта или другого растворителя, смешивающегося и с водой, и с неполярным компонентом. Поскольку в таких системах должно установиться динамическое сорбционное равновесие и очень часто состав смеси почти соответствует пределу насыщения, температуру необходимо тщательно контролировать. В динамических условиях может быть достигнута относительно высокая загрузка полярного твердого вещества жидкой неподвижной фазой вплоть до 0,5 г/г [37]. Заранее предсказать точный состав жидкой неподвижной фазы и равновесной ей подвижной фазы трудно. Поэтому изменение состава элюента (или обновление его) может приводить к изменению удерживания вследствие изменения равновесной концентрации полярного компонента.

Одно из преимуществ распределительных систем заключается в том, что на одной и той же колонке можно проводить разделение с использованием различных неподвижных фаз. Жидкую фазу удаляют промыванием колонки неполярным элюентом, например дихлорметаном. После этого колонка пригодна для нанесения новой неподвижной жидкой фазы.

Жидко-жидкостную распределительную хроматографию применяют для разделения стероидов [38, 39], кислот и их производных [40], фосфолипидов [41], нуклеозидов и их азотистых оснований [42], а также в ряде других случаев.

Для распределительной хроматографии пригодны полярные неподвижные жидкие фазы. Между распределительной хроматографией и хроматографией на обращенной фазе наблюдается аналогия: компоненты элюента распределяются между жидкой и твердой фазами (это характерно, например, для элюентов на основе водно-метанольных смесей, содержащих добавки неполярных веществ — тетрагидрофурана, дихлорметана и др., см. разд. 2.2.4.2). В разд. 2.2.5.1. обсуждены принципы ион-парной распределительной хроматографии. Разделение сахаров с помощью распределительной хроматографии на неподвижной фазе с привитыми аминогруппами и при элюировании смесью ацетонитрил — вода обсуждено в разд. 2.2.9.2.

2.2.3.5. Влияние структуры и свойств соединений на разделение. Применение неподвижных фаз на основе силикагеля в настоящее время должно быть ограничено разделением соединений, растворимых в органических растворителях. Конечно, в таких системах возможно разделение и ряда более полярных соединений, но во многих случаях разделение проходит более эффективно на химически привитых фазах на основе силикагеля. Силикагель обеспечивает наибольшую селективность при разделении соединений, имеющих различные функциональные группы и различное число таких групп. В первом приближении можно считать, что каждая группа вносит определенный вклад в удерживание, причем чем выше полярность группы, тем больше этот вклад ($-\text{H} < -\text{NO}_2 < -\text{COOR} < =\text{CO} < -\text{OH} < < -\text{NH}_2 < -\text{COOH}$) [33]. Результаты разделения замещенных изомеров бензола, например различных нитрофенолов, — наглядная иллюстрация возможностей хроматографии на силикагеле. Стерические и резонансные эффекты могут усиливать удерживание на «кислотной» поверхности силикагелей или, напротив, ослаблять его. Стероиды с экваториальным расположением замещающих групп адсорбируются на силикагеле более прочно, чем при их аксиальном расположении.

2.2.3.6. Разделение сложных смесей. Градиентное элюирование. Сложные смеси, компоненты которых существенно раз-

личаются по коэффициентам емкости, невозможно разделить в течение приемлемого периода времени, если проводить элюирование одной и той же смесью растворителей при постоянных, т. е. изократических, условиях. Для одинаково хорошего разделения слабо и сильно удерживаемых компонентов и получения хорошо различимых пиков состав элюента необходимо постоянно менять. Программируемое увеличение «силы» растворителя, или, иными словами, градиентное элюирование, увеличивает скорость разделения, но ухудшает разрешение (которое, впрочем, в большинстве случаев остается на достаточно высоком уровне). Градиентное элюирование обеспечивает оптимальные условия элюирования каждого из компонентов смеси. Принципиальной проблемой, препятствующей широкому распространению градиентного элюирования при разделении на силикагелевых неподвижных фазах, является медленное установление равновесия при изменении состава элюента. Если разделение осуществляется на химически привитых фазах, равновесие устанавливается гораздо быстрее. Вследствие важности и сложности этого вопроса он будет отдельно рассмотрен в разд. 2.2.7.

2.2.4. Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ)

Путем проведения соответствующих химических реакций с поверхностными силанольными группами можно изменить хроматографические свойства силикагеля. Если привитые группы не определяют какой-либо специфической причины изменения селективности разделения, коэффициент емкости вновь полученной неподвижной фазы меньше, чем у немодифицированного силикагеля. Однако это справедливо только для одних и тех же неполярных элюентов. Более полезные свойства химически привитых фаз проявляются при использовании полярных элюентов, поскольку в этих условиях неполярная неподвижная фаза приобретает селективность, обусловленную гидрофобным взаимодействием. Поскольку в таких системах происходит «обращение» свойств фаз, т. е. неподвижная фаза становится неполярной, а подвижная — полярной, то они получили название обращенно-фазовых систем. (Хотя лучше было бы называть их системами с неполярной неподвижной фазой.)

Привитую группу модифицируют путем введения в ее состав различных функциональных групп, вследствие чего изменяется селективность неподвижной фазы. Свойства и возможности применения таких неподвижных фаз будут рассмотрены в других разделах (при обсуждении ионообменной, гель-эксклюзионной хроматографии и т. д.). Разделение на химически привитых фазах дает определенные преимущества по сравнению с

разделением на силикагеле или при помощи распределительной хроматографии: равновесие в системе колонка — элюент устанавливается быстро, градиентное элюирование не вызывает каких-либо серьезных затруднений, время жизни колонки обычно больше.

Химически привитые фазы впервые были применены в колоночной жидкостной хроматографии для получения гидрофобных распределительных систем [43]. Впоследствии они были использованы в ГХ [44, 45] и ВЭЖХ [46]. Появление химически привитых фаз привело к настоящему буму в жидкостной хроматографии, особенно в биохимическом анализе.

2.2.4.1. Получение и свойства обращенных фаз. Концентрация силанольных групп на поверхности силикагеля составляет 7—8 мкмоль/м² [28, 29]. В результате химической реакции между силанольными группами и хлор- или алкоксигруппами алкилсиланов на поверхности силикагеля образуются новые силоксановые связи, и таким образом происходит присоединение алкильных групп силанов к поверхности силикагеля. Осуществить модифицирование всех поверхностных силанольных групп не представляется возможным: в оптимальном случае в реакцию вступает около 50% групп. Поскольку в молекулы алкилсиланов могут входить одна, две или три функциональные группы, реагирующие с кислотными силанольными группами, встает вопрос, каким должен быть поверхностный слой модифицирующего агента — мономерным или полимерным. Если обработку проводят монохлор- или моноалкоксисиланами с тремя алкильными группами (обычно с двумя метильными группами и одной алкильной цепью), полимеризация не происходит, и поверхность покрывается мономерным слоем модифицирующего агента. Если обработку проводят ди- или трифункциональными алкилсиланами, все эти группы не могут взаимодействовать с поверхностью силикагеля одновременно. В среднем в реакции участвует примерно 1,5 из 2 или 3 хлор- или алкоксигрупп [47]. Кроме ковалентного связывания с поверхностью силаны могут полимеризоваться в полисилоксаны как на поверхности (если присутствуют хотя бы следы воды), так и в растворе. Образующиеся полимеры тоже могут взаимодействовать с поверхностью силикагеля, что приводит к существенному уменьшению эффективности колонки [48].

Отличить «мономерную» привитую фазу от «полимерной» можно, сравнивая эффективность разделения на такой фазе с разделением на «голом» (немодифицированном) силикагеле при условии равенства размера частиц. Если эффективность одинакова, привитая фаза находится в «мономерной» форме, если меньше, чем у немодифицированного силикагеля (в 3—4 раза), — в «полимерной» [49].

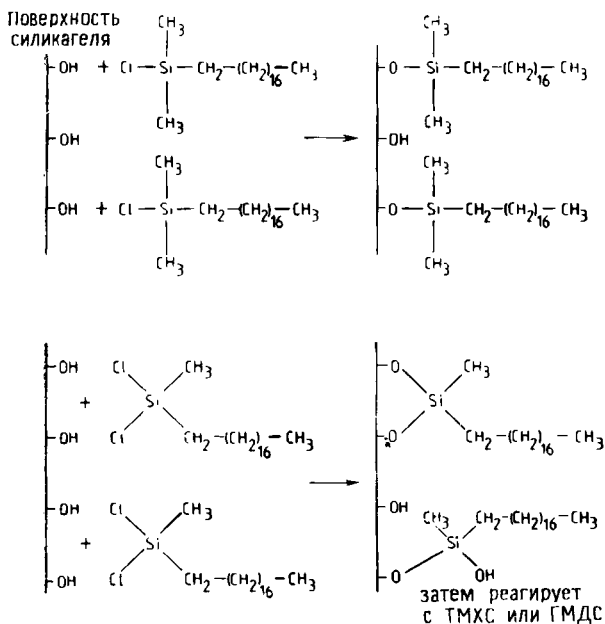


Рис. 2.8. Схема реакции получения обращенной фазы.

На рис. 2.8 приведена схема реакции между силанами и силикагелем. Непрореагировавшие хлоридные группы силана необходимо после гидролиза удалить обработкой сильным силанизирующим реагентом, например триметилхлорсиланом (ТМХС) или гексаметилдисилазаном (ГМДС). Для получения неподвижной фазы, обеспечивающей хорошее и воспроизводимое разделение, вторичная реакция силанизации обязательна. Ее также рекомендуют для получения обращенных фаз на основе монофункциональных силанов. Эти процедуры можно проводить в заполненной колонке, пропуская через нее раствор ГМДС или другого активного силанизирующего агента в толуоле при комнатной температуре. На рис. 2.9 показано влияние повторной силанизации на результаты разделения углеводов. Необходимо отметить, что эта обработка не влияет ни на общее содержание углерода, ни на относительное удерживание углеводов, тогда как относительное удерживание всех других умеренно полярных соединений меняется. Наиболее сильные изменения наблюдаются для соединений с основными свойствами, например для анилина.

Степень покрытия поверхности силикагеля алкильными группами рассчитывают исходя из содержания углерода в связанной фазе [47, 50]. В оптимальных условиях поверхностная

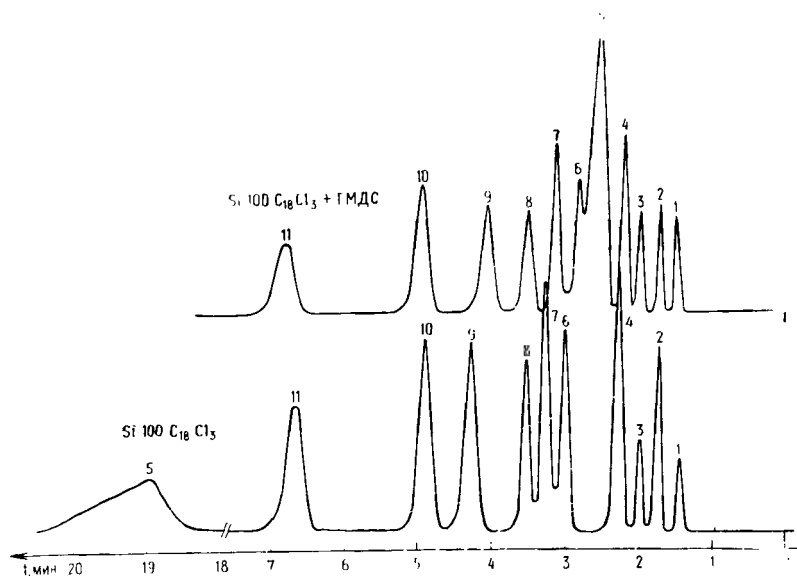


Рис. 2.9. Изменение селективности после обработки ГМДС [32].

Неподвижная фаза: C_{18} до и после обработки ГМДС; элюент: метанол/вода (65,4/35,6 по массе); объемная скорость: 1 мл/мин; проба: 1 — D_2O , 2 — бензамид, 3 — фенол, 4 — 2-фенилэтанол, 5 — анилин, 6 — нитробензол, 7 — метилвый эфир бензойной кислоты, 8 — бензол, 9 — этиловый эфир бензойной кислоты, 10 — толуол, 11 — этилбензол.

концентрация модифицированных силанольных групп может достигать 4 мкмоль/м². Эта величина уменьшается, если модифицирование проводят силанами с длинными алкильными группами или большими молекулами. У большинства обращенных фаз, полученных обработкой октадецилсиланом (RPC_{18}), степень покрытия поверхности достигает 3,0—3,5 мкмоль/м². На каждую группу C_{18} приходится 0,5 нм² поверхности, расстояние между соседними группами C_{18} составляет примерно 0,7 нм. Площадь, занимаемая одной силанольной группой на поверхности силикагеля, равна примерно 0,2 нм², а расстояние между силанольными группами 0,4 нм. Очевидно, что те силанольные группы, которые не подверглись модификации, остаются доступными для разделяемых соединений и могут влиять на их удержание.

Воспроизводимость величины степени покрытия поверхности остается хорошей до тех пор, пока используется одна и та же партия силикагеля [51]. Вследствие тенденции силикагелей к образованию коллоидов и особенностей процессов, происходящих при их хранении, часто не удается добиться высокой воспроизводимости. Смешивание различных партий силикагеля позволяет получать неподвижные фазы с воспроизводимым со-

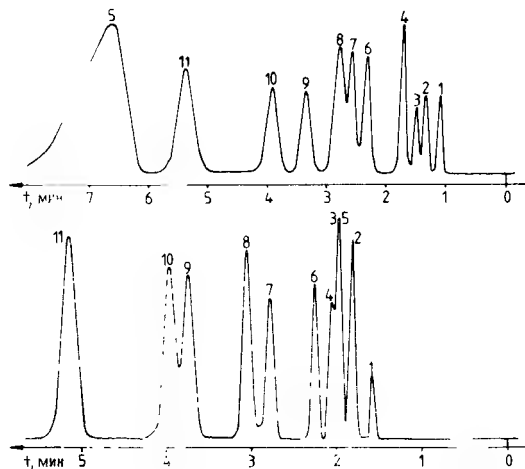


Рис. 2.10. Сравнение хроматографических свойств обращенных фаз C_{18} (условия и разделяемая смесь те же, что на рис. 2.9) [32].

держанием углерода. Однако различия в свойствах силикагеля и концентрации силанольных групп могут быть причинами плохой воспроизводимости. В результате некоторые изготовители не ставят себе целью получить максимальную степень покрытия, а ограничиваются получением обращенных фаз с определенным содержанием связанного углерода. Однако содержание силанольных групп в разных партиях силикагеля может различаться, поэтому данный критерий является в определенной степени условным. Кроме того, не удивительно, что разделение, достигнутое на неподвижной фазе с максимальной степенью покрытия, не удастся воспроизвести на неподвижной фазе с меньшей, но лучше установленной степенью покрытия. Эти проблемы знакомы каждому, кто пытался сравнивать результаты разделения на неподвижных фазах одного названия, но выпускаемых различными изготовителями. Рис. 2.10 может послужить уроком тем, кто начинает использовать обращенно-фазовую хроматографию.

Свойства обращенных фаз во многом обусловлены тем, что они являются продуктами взаимодействия силикагеля и алкилсиланов. Влияние привитых алкильных групп отражает термин «гидрофобная селективность».

В первом приближении коэффициент емкости данного разделяемого соединения k увеличивается с увеличением связанного углерода на единицу объема колонки. При одинаковой степени покрытия поверхности удерживание возрастает с увеличением длины цепи привитой алкильной группы. Максимальное удерживание обеспечивает привитая октадецильная группа. Такие неподвижные фазы предпочтительны, если растворимость разделяемых веществ в водном элюенте ограничена. Чтобы

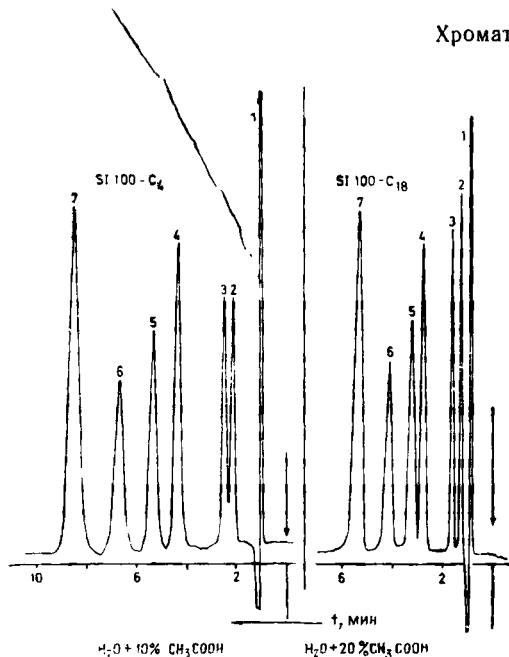


Рис. 2.11. Сравнение хроматографических свойств обращенных фаз C_4 и C_{18} на примере разделения кофейных кислот [52].

Неподвижная фаза: лихросорб SI 100, C_4 и C_{18} ; элюент: вода/уксусная кислота (10 или 20 об. %); проба: 1 — хинная кислота, 2 — хлорогеновая кислота, 3 — кофейная кислота; 4 — *p*-кумариновая кислота, 5 — *m*-кумариновая кислота, 6 — *o*-кумариновая кислота, 7 — кумарин.

получить одинаковое значение коэффициента емкости на обращенных фазах C_{18} и C_8 , в первом случае в элюент следует добавить на 10% больше органического компонента. Если возможно плохое разделение соединений гомологического ряда, предпочтительнее использовать неподвижную фазу C_{18} , поскольку селективность разделения на ней соседних членов гомологического ряда выше. В то же время для разделения соединений, молекулы которых имеют большой размер, высокую гидрофобность и ограниченную растворимость в элюенте с высоким содержанием органических добавок, рекомендуется фаза с короткими привитыми цепями.

Селективность разделения зависит от состава элюента. Элюенты с высоким содержанием органических ингредиентов (более чем 50% метанола или ацетонитрила) полностью смачивают неподвижную обращенную фазу, и относительное удерживание на них соединений — членов гомологических рядов — увеличивается с ростом длины цепи привитых алкильных групп обращенной фазы. При элюировании чистой водой подобные закономерности не наблюдаются. Относительное удерживание не изменяется, а абсолютное возрастает с увеличением длины цепи привитых алкильных групп вследствие повышения степени модифицирования по углероду [50]. Рис. 2.11 позволяет сравнить разделение некоторых производных кофейных кислот на обращенных фазах C_4 и C_{18} при элюировании обогащенным водой элюентом. Относительное удерживание в обеих системах

одинаково. Чтобы компенсировать влияние повышенного содержания углерода в фазе C_{18} , в элюент добавляют на 10% больше органического ингредиента, в данном случае уксусной кислоты, коэффициент емкости при этом остается постоянным.

Выше отмечалось (см. разд. 2.2.3.1), что для сравнения характеристик различных колонок, заполненных силикагелем, относительные величины удерживания следует нормализовать. Это же правило справедливо и для колонок с привитыми фазами. Величины коэффициентов емкости привитых фаз коррелируют не с процентным (по массе) содержанием привитых групп (по углероду), а с количеством углерода, приходящегося на единицу объема колонки. Поэтому необходимо знать плотность упаковки колонки. Эту величину может сообщить только изготовитель колонки или же ее устанавливают после удаления неподвижной фазы из колонки. Плотность заполнения колонок с привитыми фазами больше, чем колонок с немодифицированным силикагелем, например плотность заполнения колонки лихросорбом $Si\ 100$ составляет около 0,34 г/мл, а колонки с обращенной фазой C_{18} (18 масс. % C) 0,47 г/мл.

Многие типы обращенных фаз выпускают промышленными методами. Наибольшее распространение получила обращенная фаза C_{18} : ее используют для разделения как неполярных (например, эфиров жирных кислот), так и водорастворимых соединений. Второе место в списке селективных обращенных фаз занимает, по-видимому, фаза C_8 . В ряде случаев разделение проводят на короткоцепочечных привитых неподвижных фазах, приготовленных на основе диметил- или триметилхлорсиланов. На таких фазах прекрасно происходит разделение больших молекул, время удерживания которых на фазах C_8 и C_{18} очень велико.

Номенклатура обращенных фаз к настоящему моменту еще не устоялась. Обычно название дается по самой большой алкильной группе, и одна или две метильные группы, введенные дополнительно, например, с октадецильной группой, не учитываются. Все такие фазы называют C_{18} . Соответственно обращенные фазы с привитыми диметил- или триметилсилильными группами следует называть метильными, или C_1 . Однако некоторые фирмы-поставщики называют их C_2 или C_3 .

Кроме фаз с привитыми алкильными группами в обращенно-фазовой хроматографии применяются фазы с фенильными или алкилнитрильными группами. Специфическая селективность, проявляемая этими фазами особенно при элюировании неполярными не содержащими воду элюентами, может быть обусловлена различием в степени заполнения поверхности. Очень высокая селективность нитрильных фаз, проявляемая в условиях газовой хроматографии, не нашла, однако, убедительного подтверждения в жидкостной хроматографии.

2.2.4.2. Влияние состава элюента. Для обращенно-фазовой хроматографии характерен экспоненциальный рост коэффициента емкости с увеличением содержания воды в элюенте. Максимальное удерживание наблюдается при элюировании чистой водой. С целью уменьшения удерживания к воде добавляют смешивающиеся с ней органические растворители — метанол, ацетонитрил, высшие спирты, диоксан, тетрагидрофуран. Элюирующая способность в приведенном ряду возрастает (она определяется удерживанием данного растворителя на обращенной фазе при элюировании водой) [52]. К уменьшению удерживания приводит также добавление в элюент уксусной кислоты.

Поскольку органические соединения прочнее всего сорбируются из водных растворов, обращенную фазу применяют для концентрирования содержащихся в воде микропримесей органических соединений [53]. После такого обогащения пробы микропримесями проводят их ступенчатое или программируемое элюирование при градиентном увеличении элюирующей способности растворителя. Обогащение пробы и разделение целесообразно проводить на различных колонках, причем после концентрирования на аналитическую колонку следует наносить только интересующие исследователя фракции путем применения техники переключения.

Выбор растворителя — метанола, ацетонитрила, пропанола или тетрагидрофурана — определяется растворимостью в нем и некоторыми специфическими особенностями элюента. Коэффициент емкости для бензола имеет одинаковые значения при разделении на обращенной фазе C_{18} и элюировании смесью вода/метанол (1:1), вода/ацетонитрил (7:3) или вода/ТГФ (3:1) (все соотношения объемные). Селективность при разделении различных полярных производных бензола существенно отличается [54, 55]. Удерживание ароматических аминов, фенолов и карбоновых кислот при элюировании смесью вода/ТГФ значительно выше, чем при элюировании метанольной или ацетонитрильной смесью. Аналогичным образом меняется селективность и для других органических соединений, имеющих полярные функциональные группы.

Для смесей вода/ацетонитрил или вода/метанол характерна приблизительно линейная зависимость $\log k$ от процентного содержания органического компонента. Для других водно-органических элюентов наблюдается отклонение от линейной зависимости. Для водно-метанольных систем с увеличением содержания метанола коэффициент емкости k уменьшается в 10^3 — 10^4 раз. Это означает, что небольшое изменение состава элюента существенно изменяет k . С увеличением содержания органического компонента на 10% величина k уменьшается, как правило, вдвое. Следовательно, смеси элюентов необходимо готовить очень тщательно. Как показывает наш опыт, лучше

Таблица 2.4. Приготовление двухкомпонентной элюирующей смеси метанол/вода (1:1) для хроматографического разделения на обращенной фазе C_{18}

Состав смеси	Способ приготовления	Содержание H_2O , масс. %	k		
			катехин	фенол	n-крезол
1:1 (по массе)	50 г CH_3OH +50 г H_2O	50,0	0,33	0,72	1,36
1:1 (по объему)	50 мл CH_3OH +50 мл H_2O	55,9	0,47	1,03	2,05
1:1	50 мл H_2O + CH_3OH до объема 100 мл	54,7	0,44	0,97	1,90
1:1	50 мл CH_3OH + H_2O до объема 100 мл	17,0	0,51	1,11	2,24

всего и проще всего путем взвешивания, при этом воспроизводимость состава элюента достигает не менее чем 0,1%. Следует заметить, что в литературе очень часто приводят лишь соотношение компонентов элюента, забывая указать, какое это соотношение (весовое или объемное).

В табл. 2.4 на примере смеси метанол/вода (1:1) показано, какие возможны отклонения при ее приготовлении, а также продемонстрирована последовательность ошибок, допускаемых иногда при приготовлении смесей только путем измерения их объемов (одним градуировочным цилиндром). В зависимости от того, какой из компонентов наливали в цилиндр первым и каким из компонентов заполняли цилиндр до необходимого объема, соответствующие величины k существенно различаются из-за колебаний в объеме компонентов элюента.

В обращенно-фазовой хроматографии при высоком содержании органического растворителя в составе элюента наблюдается аномальное поведение белков и полипептидов [56]. При добавлении органического компонента к водному элюенту коэффициент емкости сначала уменьшается (соответствует классической ситуации), но при содержании органического компонента (например, ацетонитрила) около 30% увеличивается. Типичный пример такой зависимости k от содержания органического компонента в элюенте показан на рис. 2.12. Левая и правая ветви графика имеют большой тангенс угла наклона, поэтому воспроизводимость результатов разделения может гарантировать только тщательное и точное приготовление элюента. Причины увеличения k с повышением концентрации органического компонента в элюенте пока не выяснены. Возможно, оно обусловлено силанофильным взаимодействием между разделяемыми соединениями и неподвижной фазой или же структурными

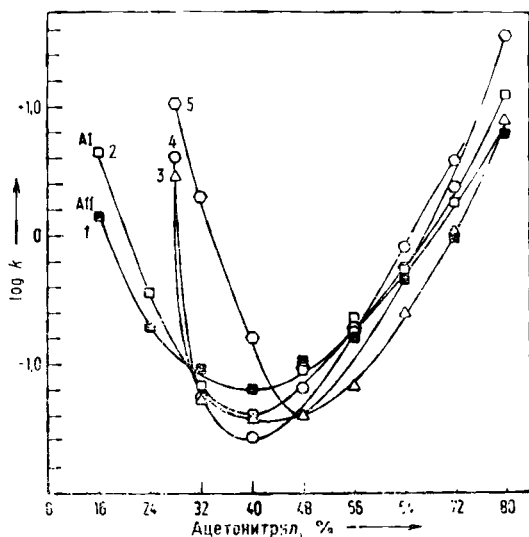


Рис. 2.12. Аномальное удерживание белков при увеличении элюирующей способности элюента [57].

Неподвижная фаза: *m*-бонда; пак C_{18} ; элюент: буфер — ацетонитрил (буфер: 15 мМ триэтиламонийфосфат, pH 2,95); проба: 1 — ангиотензин II, 2 — ангиотензин I, 3 — В-цепь бычьего инсулина, 4 — бычий инсулин; 5 — глюкагон свиньи.

изменениями соединений, возникающими при увеличении концентрации органической фазы. Разрушение пространственной структуры белков или пептидов приводит к увеличению площади, занимаемой такими молекулами на поверхности, и увеличению сил взаимодействия с поверхностью. Безусловно, денатурация и преципитация очень больших биомолекул при высокой концентрации органического компонента в элюенте могут ухудшать их разделение и снижать выход. Отчасти избежать столь нежелательных последствий можно, используя в качестве органического компонента элюента пропанол, который обладает высокой элюирующей способностью и потому может добавляться в меньших количествах, чем другие органические растворители.

Отрицательное влияние на разделение оказывает изменение вязкости смесей вода/спирт или вода/ацетонитрил. Вязкость водно-метанольных растворов достигает максимума 1,84 мПа·с (20°C) при 40%-ном (по массе) содержании метанола. Максимальная вязкость смесей вода/*n*-пропанол превышает 3 мПа·с (рис. 2.13). Изменение вязкости не влияет на удерживание разделяемых веществ, однако меняет перепад давления в системе и эффективность колонки (см. разд. 2.1.2). Вязкость можно снизить путем увеличения температуры колонки.

Изменение температуры, однако, оказывает влияние на абсолютное и относительное удерживание, поскольку меняется теплота сорбции. Для стандартных разделительных систем ($0,5 < k < 3$) теплота сорбции составляет 10—20 кДж/моль, и с изменением температуры на 1°C величина k меняется на 1—

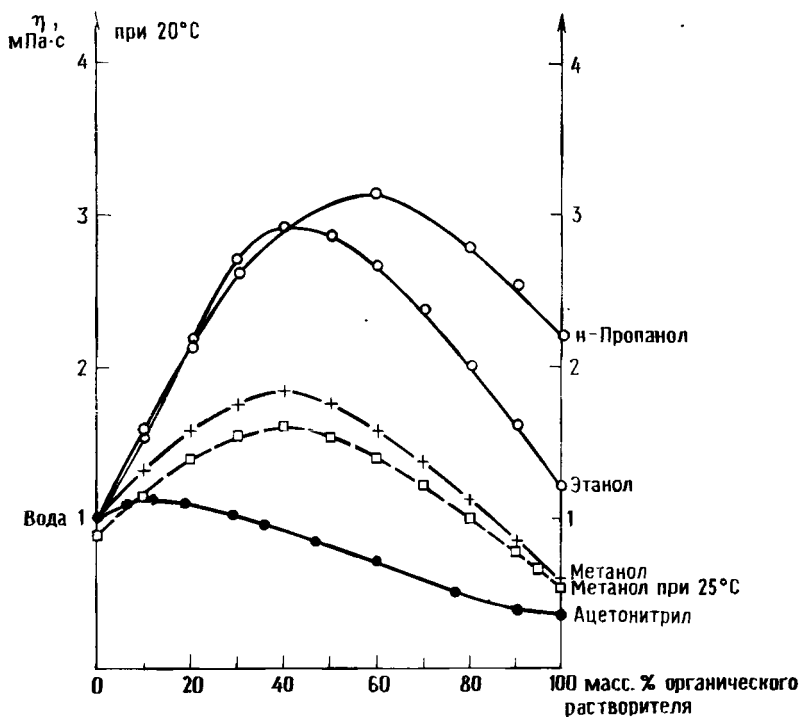


Рис. 2.13. Изменение вязкости водно-органических смесей [2].

2,5%. Следовательно, температура элюента, системы отбора пробы и колонки должна тщательно контролироваться, так как только при этом условии удастся получить воспроизводимые результаты.

Изменить относительное удерживание при элюировании водно-метанольными растворами можно, добавляя в элюент второй органический компонент [54, 55, 58], например дихлорметан или тетрагидрофуран. На обращенной фазе сорбируется неполярный компонент элюента (при содержании метанола 50%), и свойства получаемой фазы отличаются от исходной. На рис. 2.14 показано влияние добавок второго органического компонента в элюент на разделение фенилтиогидантоиновых производных аминокислот [59].

Следует отметить, что выбор элюента и оптимизация условий разделения — задача достаточно сложная, особенно для тех, кто лишь начинает заниматься ВЭЖХ. Наиболее быстрый способ выбора оптимального изократического состава элюента — это проведение градиентного элюирования (см. разд.

2.2.7.2). В литературе описаны и другие способы оптимизации состава элюента [60—62]. Во всяком случае, целесообразно провести предварительное разделение при элюировании стандартными смесями элюентов, например вода/метанол, вода/ацетонитрил, вода/ТГФ. Состав элюента следует менять до тех пор, пока не будет достигнуто удовлетворительное значение коэффициента емкости. Далее следует попытаться вводить в элюент различные органические компоненты, различающиеся донорно-акцепторной способностью или дипольным взаимодействием. Такая процедура оптимизации дает очевидные результаты, если известны все компоненты разделяемой смеси. Вне зависимости от метода оптимизации интерпретация получаемых результатов затруднена, если не известно число компонентов, содержащихся в разделяемой смеси. В такой ситуации, чтобы установить, происходит или не происходит перекрывание пиков, для их дифференциации необходима дополнительная информация.

До сих пор речь шла только об оптимизации состава элюента, предназначенного для разделения соединений, не диссоциирующих на ионы. В тех случаях, когда предстоит осуществить разделение кислот или оснований, необходима дополнительная оптимизация состава элюента. Варианты решения такой проблемы рассмотрены на примере разделения двух изомерных аристоксоловых кислот — производных нитрофенантренкарбоновой кислоты (рис. 2.15). При элюировании чистым метанолом изомеры разделяются лишь частично со слабым запаздыванием. В соответствии со сказанным выше можно было бы ожидать, что добавление в элюент 20% метанола увеличит удерживание и улучшит разделение. Однако кислоты элюируются перед инертной пробой и не проникают в поры неподвижной фазы. Причиной тому служит наличие внутри пор непрореагировавших, но диссоциированных силанольных групп, создающих допканов-

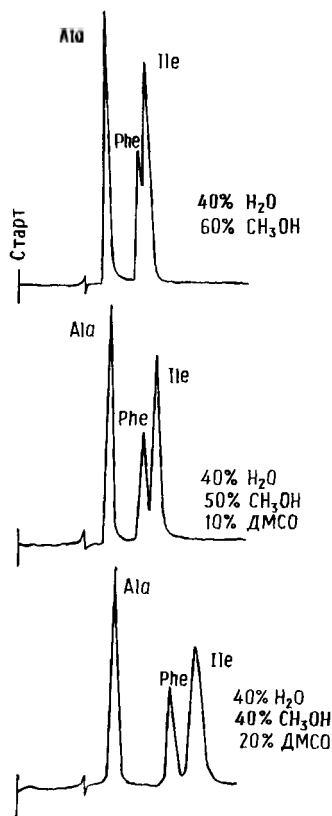


Рис. 2.14. Тройные элюирующие смеси. Разделение фенилтиогидантоиновых производных аминокислот [59].

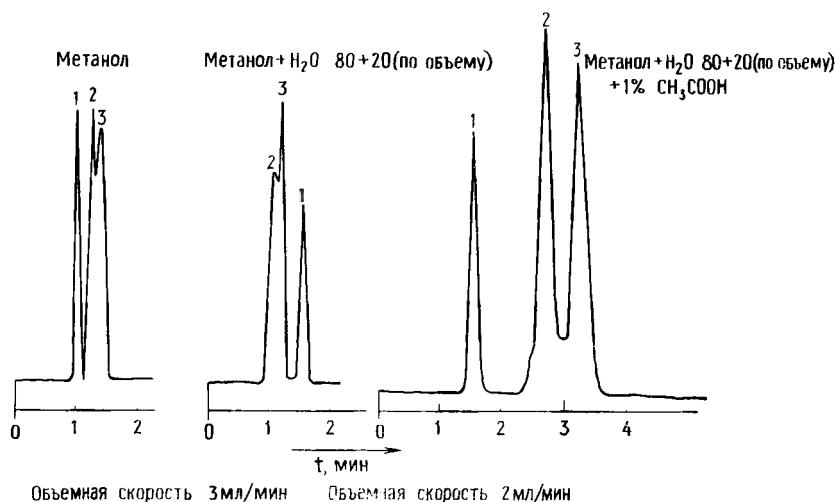


Рис. 2.15. Эксклюзия и удерживание при разделении в обращенно-фазовой хроматографии аристолоховых кислот [50].

1 — инертное соединение, 2, 3 — изомерные кислоты.

ский потенциал [63]. Добавление в элюент 1% уксусной кислоты подавляет диссоциацию как силанольных, так и карбоксильных групп, что приводит к увеличению удерживания карбоновых кислот и их разделению.

Силанольные группы могут взаимодействовать с соединениями, обладающими основными свойствами по ионообменному механизму. Это нежелательное в данном случае взаимодействие предотвращают путем добавления в элюент соединений с основными свойствами или солей. Рис. 2.16 показывает, как велико влияние добавок триэтиламина (ТЭА) в концентрации порядка 10^{-4} % на эффективность разделения соединений с сильноосновными свойствами.

Проблемы, связанные с образованием хвостов у пиков основных или кислотных соединений, характерны не только для ВЭЖХ, они знакомы всем, кто имеет дело с бумажной и тонкослойной хроматографией. Чтобы избежать их образования, в подвижную или неподвижную фазу следует ввести кислотные или основные добавки.

Добавлением в элюент нейтральных солей можно свести до минимума влияние силанольных групп на характер элюирования способных к диссоциации растворенных соединений. Эти добавки увеличивают полярность элюента и в результате увеличивают коэффициент емкости неполярных органических молекул. Такое «высаливание» органических соединений на неподвижной фазе можно использовать для выбора необходимого времени удерживания (см. разд. 2.2.5 и 2.2.6).

В приведенных выше примерах минимизация влияния процесса диссоциации силанольных групп на результаты разделения достигалась на основе закона действующих масс (вследствие увеличения содержания в элюенте органических или неорганических электролитов). К уменьшению диссоциации приводит также добавление в элюент органических кислот или оснований, обладающих большей гидрофобностью. В последнем случае может происходить образование ионных пар и разделение будет осуществляться по ионному механизму (что сопровождается изменением селективности). Принципы ион-парной хроматографии рассмотрены в разд. 2.2.5.

В условиях обращенно-фазовой хроматографии возможны затруднения при определении мертвого времени колонки t_M [2, 64, 129]. Точное значение t_M необходимо для определения свободного объема колонки, объемной скорости элюента, а также параметров удерживания k и α . Обычно t_M определяют по времени выхода элюента, вводимого в колонку

вместе с анализируемой пробой. В этих целях можно использовать дейтерированный элюент, но для его обнаружения необходим дифференциальный рефрактометр. Водно-органические элюенты дают иногда не один, а два пика. В этом случае, используя смесь органического компонента с D_2O в идентичной концентрации можно получить один пик, характеризующий t_M . Применение УФ-детекторов для определения t_M ограничено недостаточной чистотой органических растворителей, используемых в составе элюентов, в которых роль инертного растворен-

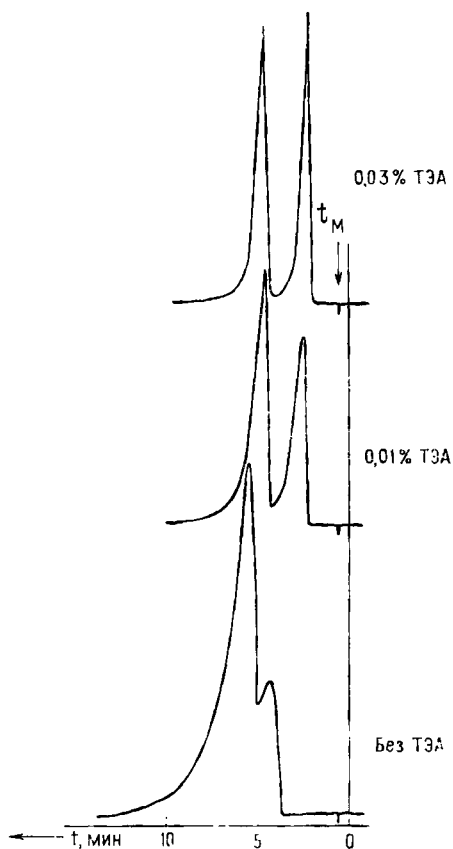


Рис. 2.16. Влияние силанольных групп на удерживание и их маскирование триэтиламина (ТЭА).

Неподвижная фаза: лихросорб Si 100, C_{18} , обработанный гексаметилдисилазаном; элюент: метанол/вода (0,01 М KH_2PO_4) (2/8 по объему) с добавками ТЭА; проба: прокаинамид, N-ацетилпрокаинамид.

ного соединения может играть нитрометан. Мертвое время, определенное в органических элюентах, можно применить и для расчетов при разделении в водном элюенте, так как у неподвижных фаз на основе силикагеля ни пористость, ни плотность упаковки при переходе от органических элюентов к воде и наоборот не меняются. В табл. 2.2 (см. разд. 2.1.3) суммированы некоторые предположения, касающиеся определения t_M . Отметим в заключение, что определение t_M при помощи окрашенных анионов или катионов неприемлемо, так как велика вероятность их специфического ионного взаимодействия с силанольными группами.

2.2.4.3. Влияние на удерживание структуры разделяемых соединений. Влияние структуры разделяемых соединений на время их удерживания в обращенно-фазовой хроматографии проследить легче, чем при разделении на немодифицированном силикагеле. В первом приближении можно принять, что время удерживания возрастает с уменьшением растворимости соединений в воде, т. е. с уменьшением их полярности. В гомологических рядах прибавление каждой метиленовой группы увеличивает время удерживания (энергия сорбции возрастает при этом примерно на 600 Дж/моль). Время удерживания органических соединений, имеющих разветвленные алкильные группы, меньше, чем линейных соединений с такой же молекулярной массой, причем чем больше степень разветвления, тем меньше время удерживания. Насыщенные углеводороды элюируются раньше, чем ненасыщенные. Влияние наличия функциональных групп на время удерживания иллюстрирует рис. 2.17. Если элюирование осуществляют водой, то наличие двух метильных групп в качестве заместителей оказывает такое же влияние на время удерживания, как одна этильная группа. Такой же эффект отмечен для хлорфенолов. Наличие одной нитрогруппы увеличивает k , однако вторая и третья нитрогруппы значительно уменьшают k (пикриновая кислота и динитрофенол хорошо растворимы в воде). Такой же эффект характерен также для гидроксифенолов.

Приведенные выше правила справедливы и для удерживания стероидов и органических соединений других классов. Гидроксистероиды элюируются перед стероидами с карбонильными группами, находящимися в том же положении. Ацетилирование гидроксильных групп увеличивает время удерживания стероидов.

Наличие ионогенных групп обычно не влияет на удерживание. Этот факт используют для изменения порядка элюирования, например дипептидов, путем изменения pH элюента. Так, при высоком pH Trp-GlyO⁻ элюируется после Gly-TrpO⁻, так как ионизирующаяся часть молекулы в большой степени сольвати-

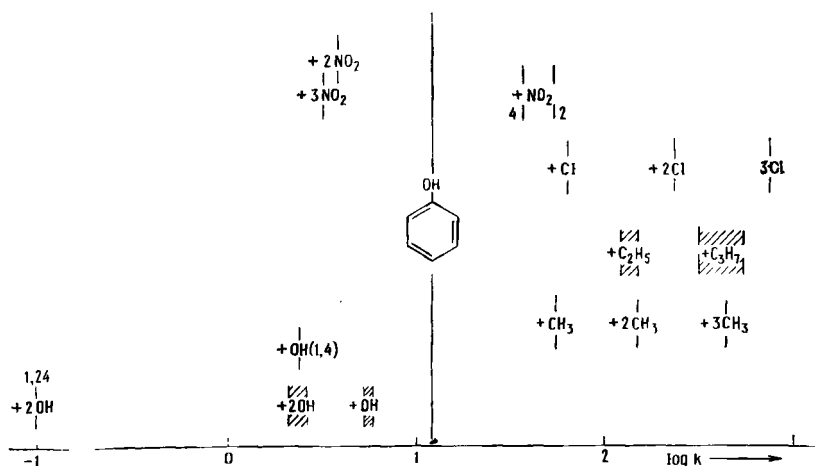


Рис. 2.17. Влияние структуры разделяемых соединений на время удерживания производных фенола [2].

Неподвижная фаза: обращенная фаза C_{18} ; элюент: вода.

рована и поэтому не взаимодействует с гидрофобной неподвижной фазой. При низких значениях pH часть пептида с протонированным амином сольватирована в большой степени, и поэтому $H^+Gly-TrpOH$ элюируется после $H^+Trp-GlyOH$. При pH, соответствующем изоэлектрической точке, разделить цвиттер-ионы не удается [65].

Детальное обсуждение природы гидрофобных или органо-фобных взаимодействий и теоретические основы процесса приведены в работах [4, 66].

2.2.5. Вторичные равновесия в обращенно-фазовой хроматографии

2.2.5.1. Ион-парная хроматография.

Условия разделения соединений, диссоциирующих в водном растворе, можно, как и в бумажной или тонкослойной хроматографии, оптимизировать путем такого изменения pH элюента или неподвижной фазы, которое приведет к подавлению диссоциации. В результате можно добиться получения более узких хроматографических зон разделяемых соединений или, иными словами, более эффективного разделения и симметричных пиков, как при элюировании нейтральных соединений. В то же время в элюент целесообразно добавлять органические кислоты или основания, которые играют роль «противоионов», взаимодействующих с разделяемыми веществами. В таких системах всегда должна присутствовать «органическая» фаза — как элюент или как не-

подвижная фаза. Другими словами, необходимо образование способных диссоциировать «ионных пар», экстрагируемых «органической» фазой. Образование ионных пар существенно влияет на удерживание ионогенных компонентов пробы, но не влияет на удерживание неионогенных компонентов. В результате возникает дополнительная возможность оптимизации условий разделения веществ, а также идентификации ионогенных компонентов сложных смесей при помощи так называемого «метода сдвига пиков».

В основу ион-парной хроматографии (ИПХ) положены принципы классической экстракции из водной в органическую фазу ионных веществ в виде ион-парных соединений [67]. Эти принципы были перенесены в хроматографию, причем в зависимости от типа используемых фаз метод разделения получил разные названия. Синонимы ИПХ — экстракционная хроматография, жидкостная ионообменная хроматография, пар-ионная хроматография (ПИХ) и детергентная хроматография [66, 68]. Последние два названия предпочтительны, если в качестве неподвижной применяют обращенную фазу.

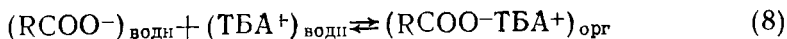
Вначале разделение по методу ион-парной ВЭЖХ проводилось на колонках, заполненных силикагелем, на поверхность которого были нанесены из водного раствора буфер и соль для формирования ионных пар. В рассматриваемом примере солью служил нафталинсульфонат натрия, а элюентом — хлороформ. Указанная хроматографическая система применялась для разделения алифатических аминов или дипептидов. Разделяемые соединения образовывали ионные пары в результате взаимодействия аминогрупп с нафталинсульфонатом и в виде ионных пар экстрагировались в подвижную фазу. Ионные пары, в состав которых входили соединения алифатического ряда, обнаруживали УФ-детектором [69].

Наиболее широкое распространение в ИПХ получили обращенные фазы, поскольку добиться установления равновесия в колонке, предварительно заполненной силикагелем, при пропускании через нее водных растворов солей или путем изменения нанесенной фазы достаточно сложно. В ИПХ существуют широкие возможности для оптимизации условия разделения, поскольку допускается изменение pH, концентрации и вида противоионов в составе элюента. Для разделения можно использовать водные растворы проб, поэтому ИПХ широко применяют для разделения биохимических объектов.

Механизм разделения методов ион-парной хроматографии можно пояснить на двух экстремальных примерах. В водных элюентах противоионы и ионы разделяемых соединений образуют диссоциирующие ионные пары (в подвижной фазе), которые селективно удерживаются на неподвижной фазе и в результате разделяются. Если противоионы адсорбируются на непод-

вижной фазе, ионы разделяемых соединений взаимодействуют с ними, удерживаются и соответственно разделяются. В зависимости от природы противоиона, его гидрофобности, содержания органического компонента в элюенте, гидрофобной или гидрофильной природы компонентов проб доминирует тот или другой механизм разделения.

В простейшем случае, когда органическая кислота сорбируется в виде ионной пары с тетрабутиламмониевым ионом, ионы находятся в элюенте, а ионные пары сорбируются на неподвижной фазе [8].



Процесс сорбции можно описать при помощи константы равновесия E :

$$E = \frac{[\text{RCOO-TBA}^+]_{\text{орг}}}{[\text{RCOO}^-]_{\text{водн}} [\text{TBA}^+]_{\text{водн}}} \quad (9)$$

Экстракционное равновесие зависит от рН элюента, ионной силы, температуры, свойств органического компонента элюента и вида противоиона. Коэффициент емкости k разделяемых соединений пропорционален константе равновесия и концентрации противоионов в водной подвижной фазе:

$$k \sim E[\text{TBA}^+]_{\text{водн}} \quad (10)$$

Ситуация осложняется тем, что на удерживание оказывают влияние и другие ионы, вводимые вместе с противоионом или находящиеся в пробе, ионная сила элюента, вид буфера, органический компонент элюента и температура. Варьирование этих параметров позволяет проводить оптимизацию условий разделения. Далее мы обсудим некоторые важнейшие принципы ИПХ.

Тип противоиона. Как отмечалось выше, коэффициент емкости увеличивается пропорционально концентрации противоиона (рис. 2.18). При разделении длинноцепочечных алкилсульфатов k может уменьшаться при значительном увеличении их концентрации в пробе. С увеличением концентрации децилсульфата k сначала растет, а затем уменьшается [51], что объясняют насыщением неподвижной фазы алкилсульфатом, придающим ей свойства ионообменника. В то же время децилсульфат обладает свойствами поверхностно-активного вещества и проявляет тенденцию к мицеллообразованию, что приводит к снижению k . Подобные явления ограничивают возможности применения гидрофобных ионных пар в водных элюентах. Для гидрофильных ионных пар зависимость k от концентрации противоиона выражена менее сильно. Подобные корреляции были отмечены для процессов экстракции кислот четвертичными аммониевыми ионами, различающимися по гидрофобности.

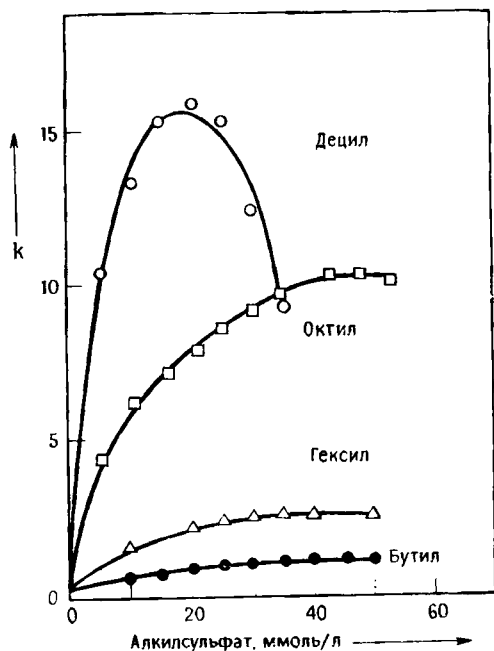


Рис. 2.18. Зависимость удерживания от природы противоиона и его концентрации [51].

Неподвижная фаза: партисил ODS; элюент: 0,05 М водный раствор фосфата, pH 2,55, содержащий различные концентрации противоионов; проба: адреналин [51].

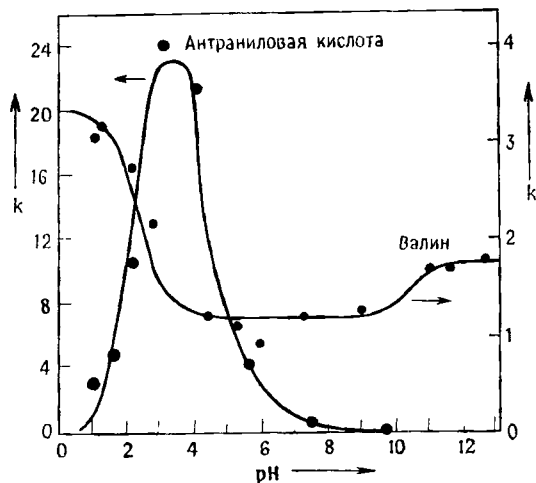


Рис. 2.19. Удерживание амфолитов на сшитом полистироле при различных pH [70].

Влияние рН. Контроль ионизации реагентов — необходимое для ИПХ условие. Влияние рН на коэффициент емкости валина и антраниловой кислоты иллюстрирует рис. 2.19. Удерживание валина минимально при значениях рН, близких к нейтральному — в условиях образования цвиттер-ионов. При низких значениях рН коэффициент емкости принимает более высокие значения, чем при высоких рН: вклад недиссоциированной карбоксильной группы в удерживание, вероятно, больше, чем вклад протонированной аминогруппы. Антраниловая кислота при нейтральных значениях рН не заряжена и сильно удерживается на неподвижной фазе. Для заряженных форм кислоты при низких или, напротив, высоких значениях рН коэффициент емкости имеет меньшие значения, чем при нейтральных рН. Коэффициент емкости существенно изменяется, если рН элюента имеет значение, близкое к величине pK конечной группы кислоты или основания (рис. 2.19). Поскольку валин и антраниловая кислота обладают свойствами как кислоты, так и основания, такие изменения k происходят соответственно при высоких и низких значениях рН.

Величину pK_I определяют из зависимости k от рН [71, 72]. Селективность разделения кислот и оснований достигает максимального значения в области их pK_I . Однако вследствие того, что в этой же области коэффициент емкости сильно зависит от рН, воспроизводимость результатов разделения в данных условиях невелика. Дополнительные проблемы возникают в том случае, если изменяют органический компонент элюента, поскольку рН и pK_I зависят от содержания в нем органической фазы. Как правило, изменение рН примерно на 0,1 ед. приводит к изменению k на 10%. Температура также оказывает влияние на рН и pK_I , следовательно, в ИПХ кроме рН необходимо тщательно контролировать и температуру.

Влияние состава элюента. Водные буферные растворы используют в качестве элюента в ИПХ относительно редко. рН буфера изменяется в присутствии органического компонента (если концентрация последнего превышает 25%). При концентрации органического компонента 25—50% эффективное значение рН примерно на 0,1—0,2 ед. ниже, чем измеряемое в водном растворе при помощи стеклянного электрода [68]. Классические определения понятий рН, буферной емкости, диссоциации не применимы, если содержание органического компонента в водно-органических смесях превышает 50%.

Наличие органического компонента в элюенте оказывает сильное влияние на pK_I разделяемых соединений [68]. Причина этого заключается в изменении диэлектрической проницаемости элюента, а также во взаимодействии разделяемых соединений с компонентами элюента. Величины pK_I органических кислот увеличиваются пропорционально увеличению концентрации

метанола в элюенте. Однако ожидаемой обратной зависимости между концентрацией метанола и диэлектрической проницаемостью не наблюдается. Наиболее значительное изменение pK_I наблюдается в том случае, если концентрация метанола составляет 80 об. % и выше. Величина pK_I бензойной кислоты меняется при концентрации метанола 20—60 об. %; например, $\Delta pK_I \approx 0,4$ при повышении концентрации метанола от 20 до 40%. Для катионогенных кислот типа производных анилина минимальное изменение pK_I наблюдается при концентрации метанола 80%.

Увеличение ионной силы элюента также влияет на pK_I , поскольку диссоциация ионогенных групп увеличивается в соответствии с законом действующих масс [72]. Повышение температуры от 20 до 60°C оказывает на pK_I незначительное влияние ($\Delta pK_I \approx 0,1$).

Выбирая органический компонент элюента, следует придерживаться тех же правил, что и в обращенно-фазовой хроматографии (см. разд. 2.2.4.2). Ацетонитрил предпочтительнее метанола, поскольку обладает несколько большей сольватирующей способностью. Производные тетраалкиламмония лучше сольватируются в ацетонитриле, следовательно, при разделении этих соединений при помощи ИПХ и элюировании смесями, содержащими ацетонитрил, результаты разделения зависят от состава элюента сильнее, чем при элюировании водно-метанольными смесями. Диметилсульфоксид отличается большим сольватирующим эффектом, чем вода, по отношению к катионам. Дополнительные возможности для оптимизации условий разделения при помощи ИПХ обеспечивает использование элюентов на основе тройных смесей.

В обращенно-фазовой хроматографии уравнивание колонки элюентом и противоионом часто требует много времени, особенно если противоион имеет большую алкильную группу и используется в большой концентрации. Уменьшение концентрации такого противоиона позволяет снизить время, необходимое для достижения состояния равновесия (примерно до 1 ч). При проведении разделения в режиме обращенно-фазовой ион-парной хроматографии трудно, а часто и невозможно полностью регенерировать колонку, поскольку четвертичные аммониевые соединения способны необратимо адсорбироваться на поверхности сорбента вследствие взаимодействия с немодифицированными силанольными группами.

ИПХ представляет собой прекрасный метод аналитического разделения способных к диссоциации соединений. Он дает минимальное размывание полосы, эффективность колонки соответствует достигаемой при разделении нейтральных соединений. Предсказать хроматографическое удерживание соединений можно исходя из простого ионного механизма. Пики ионоген-

ных соединений легко сместить в такую область, в которой отсутствуют пики нейтральных соединений. Однако возможности использования ИПХ в препаративных целях ограничены в связи с тем, что противоионы, присутствие которых в элюенте обязательно, очень трудно удалить и из элюента, и из полученных фракций пробы.

2.2.5.2. Другие виды вторичных равновесий. Явление комплексообразования в подвижной и (или) на неподвижной фазах используют для увеличения селективности разделения. Например, нитрат серебра влияет на селективность и изменяет удерживание ненасыщенных углеводородов, образующих с ним полярные комплексы, элюирующиеся гораздо раньше, чем исходные соединения [73]. Удерживание ненасыщенных углеводородов увеличивается, если нитрат серебра нанесен на неподвижную фазу, например силикагель или катионообменник [74].

Добавки хелатов металлов также увеличивают селективность разделения. Хелаты на основе триаминов и ионов цинка или кадмия увеличивают селективность ион-парного разделения ароматических кислот [68]. При помощи хиральных тридентатных аминов можно осуществить разделение дансилпроизводных энантиомерных аминокислот [75]. В работе [76] описаны системы для хирального разделения аминокислот на основе хелатов ионов металлов. В данном случае оптически чистые аминокислоты выполняют в присутствии ионов меди(II) роль добавок.

2.2.6. Ионообменная хроматография

Основная область применения ИОХ в биохимическом анализе — это разделение аминокислот. Аминокислоты адсорбируются на катионообменнике (полимерная матрица с сульфогруппами) и элюируются при изменении pH и ионной силы водного элюента. Классический тип ионообменников представляет собой набухший гель, механическая прочность которого ограничена, что затрудняет его широкое применение в ВЭЖХ. Механическая прочность неподвижных фаз увеличивается в результате их сшивки, которая, однако, сопровождается уменьшением среднего диаметра пор. В итоге диаметр пор у механически прочных ионообменников может быть столь незначительным, что возможность их применения в биохимическом анализе автоматически исключается [77]. Характерная особенность ионообменников этого типа — способность сжиматься или набухать в соответствии с изменением pH или ионной силы элюента.

2.2.6.1. Свойства ионообменников на основе силикагеля. Попытки получить ионообменники повышенной механической прочности предпринимались еще на ранних этапах развития

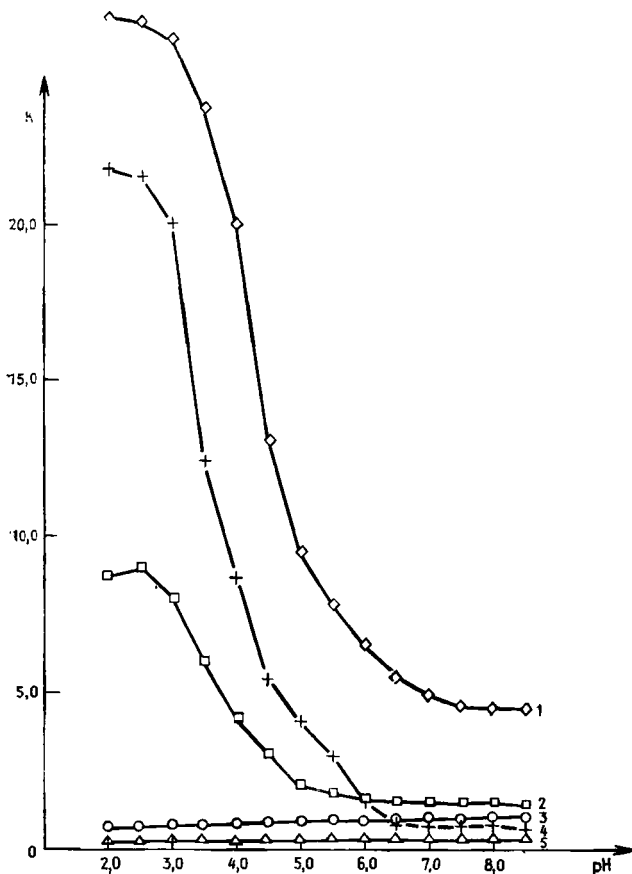


Рис. 2.20. Удержание азотистых оснований на катионообменнике при разных pH.

Неподвижная фаза: нуклеосил 10SA; элюент: фосфатный буфер (ионная сила $I = 0,1$ M); проба: 1 — аденин, 2 — гуанин, 3 — тимин, 4 — цитозин, 5 — урацил.

ВЭЖХ. В этих целях использовали поверхностно-пористые сорбенты, представляющие собой непроницаемые стеклянные частицы, покрытые тонким пористым слоем ионообменника [78]. Очевидно, что емкость таких ионообменников невелика [78]. В настоящее время распространение получили ионообменники на основе силикагеля с химически привитыми поверхностными ионообменными группами. Катионообменники имеют фенол- или алкилсульфогруппы, анионообменники — амино-(слабые) или четвертичные аммониевые группы (соответственно сильные анионообменники). Хотя удельная обменная емкость (ммоль/г) ионообменников на основе силикагеля в 4 и более раз уступает таковой для ионообменников на основе полистирола, вследствие более высокой плотности упаковки колонок с силикагелем обменная емкость (в расчете на 1 мл колонки) колонок с силикагелем всего вдвое меньше, чем у соответствующих

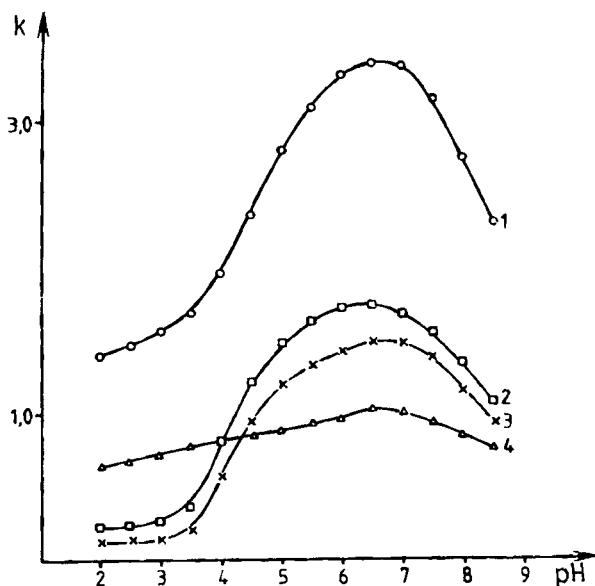


Рис. 2.21. Удерживание монофосфатов на анионообменнике.

Неподвижная фаза: четвертичный аммониевый катион в форме хлорида; элюент: фосфатный буфер ($I=0,1$ M); проба: 1 — ГМФ, 2 — АМФ, 3 — ЦМФ, 4 — УМФ.

щих колонок, заполненных сорбентом на основе полистирола. В настоящее время выпускаются материалы на основе силикагеля с обменной емкостью от 0,1 до 1 ммоль/г (все данные отнесены к 1 ионному эквиваленту). На селективность ионообменной системы оказывает влияние ионная эксклюзия, обусловленная существованием потенциала Доннана [63], а также гидрофобным взаимодействием между разделяемыми соединениями и органической матрицей.

Чем больше емкость ионообменника, тем, очевидно, больше коэффициент емкости. На рис. 2.20 приведена зависимость k от pH, полученная при разделении пуриновых и пиримидиновых оснований на катионообменнике [79]. При низких значениях pH протонированные аммониевые группы могут взаимодействовать с кислотными сульфоновыми группами сорбента. Наибольшие изменения k наблюдаются при значениях pH, лежащих вблизи pK_t оснований.

Урацил и тимин не ионизируются в том диапазоне pH, который приведен на рис. 2.20, поэтому они не удерживаются ионообменником. Удерживание этих, а также поддающееся измерению удерживание других оснований при высоких значениях pH происходит вследствие гидрофобного взаимодействия с органическими группами, привитыми к поверхности силикагеля.

Зависимость от pH удерживания нуклеотидов (монофосфатов) на сильном анионообменнике, содержащем четвертичные

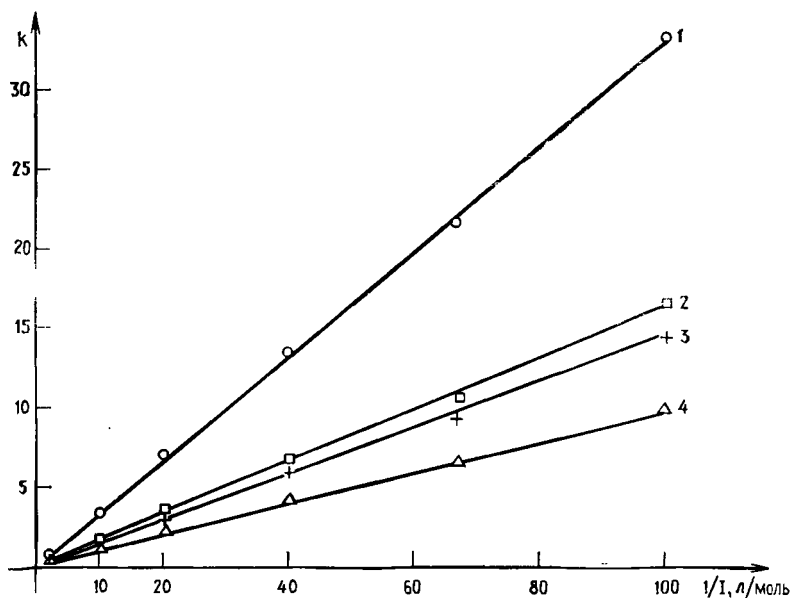


Рис. 2.22. Зависимость коэффициента емкости от ионной силы (условия те же, что на рис. 2.21); рН 7,0; необходимая ионная сила достигалась в результате добавления соответствующего количества NaCl.

аммониевые группы, показана на рис. 2.21 [79]. При низких величинах рН фосфат протонирован и не взаимодействует с четвертичными аммониевыми группами. С увеличением рН фосфат диссоциирует, и нуклеотиды удерживаются на неподвижной фазе. При рН около 7 увеличивается количество гидроксидных групп, конкурирующих с фосфатными в процессах ионного обмена. Гидроксид-ионы вытесняют молекулы разделяемых соединений с поверхности ионообменника, что приводит к уменьшению коэффициента емкости по нуклеотидам. Нуклеотиды этих трех групп легко разделяются при помощи ИОХ, поскольку дифосфаты удерживаются сильнее, чем монофосфаты, а трифосфаты — сильнее, чем дифосфаты.

2.2.6.2. Оптимизация условий разделения. Как отмечалось в предыдущем разделе, рН элюента представляет собой важный параметр, влияющий на процесс удерживания. Не меньшую роль играет и ионная сила, ее увеличение вызывает уменьшение коэффициента емкости. Если удерживание осуществляется только по механизму ионного обмена, то зависимость k от обратного значения ионной силы имеет вид прямой, выходящей из начала координат. На рис. 2.22 эта зависимость

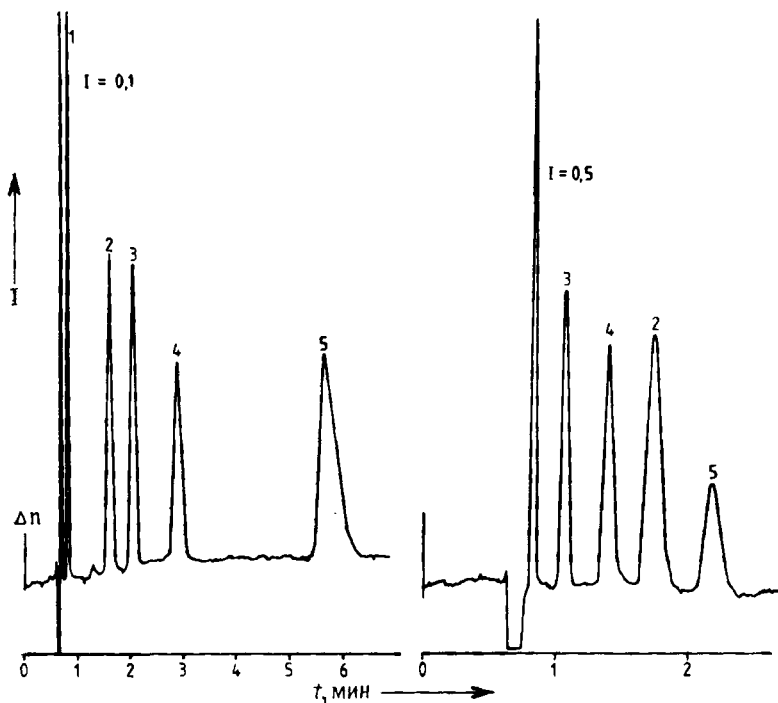


Рис. 2.23. Гидрофобное взаимодействие аминокислот с ионообменником.

Неподвижная фаза: катионообменник на основе силикагеля; элюент: цитратный буфер, pH 4,8, с NaCl ($I=0,1$ и $0,5$); проба: 1 — D_2O (инертное соединение), 2 — фенилаланин, 3 — лизин, 4 — гистидин, 5 — аргинин.

проиллюстрирована на примере анионообменника с четвертичными аммониевыми группами [79].

Интерпретировать влияние ионной силы на удерживание более сложно, если кроме ионного обмена наблюдается гидрофобное взаимодействие неподвижной фазы и разделяемых веществ. В этом случае возможна конкуренция двух процессов — ионного обмена (k уменьшается с увеличением ионной силы) и высаливания (см. разд. 2.2.4.2), если с увеличением ионной силы k увеличивается. На рис. 2.23 приведен пример разделения аминокислот на катионообменнике при двух значениях ионной силы [79]. При низкой ионной силе фенилаланин элюируется первым, непосредственно после выхода инертного вещества ($k=1,33$). Увеличение ионной силы от 0,1 до 0,5 при сохранении прочих условий приводит к изменению порядка элюирования: фенилаланин элюируется предпоследним. Значения k других аминокислот в рассматриваемом примере существенно уменьшались (например, для аргинина от 7,2 до 2,1),

напротив, k фенилаланина несколько возрастал (до 1,44). Увеличение k фенилаланина — гидрофобной аминокислоты — обусловлено эффектом высаливания. Для уменьшения влияния гидрофобного взаимодействия в элюент добавляют органический растворитель (см. разд. 2.2.4.2). Следует отметить, что ионообменники и водно-метанольные элюенты приемлемы для разделения незаряженных нейтральных веществ, например сахаров [80], и что осуществляется оно по распределительному механизму (см. разд. 2.2.4.2).

Недостаточная оптическая прозрачность буферных растворов при низких длинах волн в УФ-области спектра, особенно при длинах волн ниже 230 нм, представляет собой серьезное препятствие. Наличие полифосфатов в фосфатных буферных растворах может вызывать дрейф нулевой линии, если обнаружение проводят при длине волны 254 нм. Состав буфера влияет также на селективность разделения. Как и в адсорбционной хроматографии, элюирующая способность катионов и анионов увеличивается с увеличением прочности их сорбции на данном ионообменнике, например при разделении аминокислот литий-цитратный буфер — более слабый элюент, чем натрий-цитратный. В классической ИОХ существуют ряды анионов и катионов, определяющие изменение элюирующей способности. Для сильных ионообменников элюирующая способность анионов уменьшается в следующем ряду: цитрат > оксалат > I^- > HSO_4^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > формиат > ацетат > OH^- > F^- . Элюирующую силу катионов для сильных катионообменников характеризует такой ряд: Fe^{3+} > Ca^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+} > Ag^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Cu^+ .

В заключение отметим, что на селективность разделения может оказывать влияние специфическое взаимодействие разделяемых соединений с катионами или анионами, приводящее к комплексообразованию.

2.2.6.3. Ионообменная хроматография аминокислот. Аминокислоты в виде цвиттер-ионов не удерживаются на ионообменнике, поскольку не участвуют в ионном обмене, но разделить их на катионообменнике можно, используя различие в их изоэлектрических точках. На рис. 2.24 приведена зависимость коэффициента емкости от рН элюента [79]. Разделение смеси, содержащей все известные аминокислоты, возможно только при элюировании в градиенте рН. (Возможности градиентного элюирования обсуждаются в разд. 2.2.7.)

Обнаружение аминокислот сопряжено с определенными трудностями, так как они не обладают специфической способностью к поглощению света в УФ-области спектра. В классическом ионообменном анализе аминокислот обнаружение осуществляется колориметрическим методом по реакции с нингидрином,

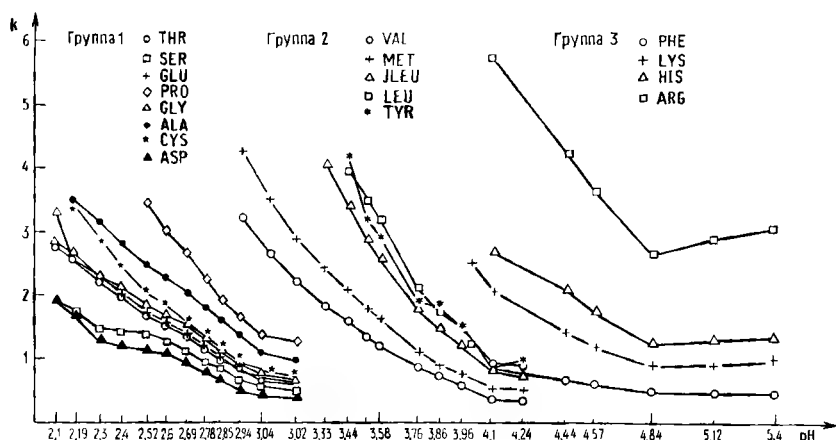


Рис. 2.24. Удерживание аминокислот при различных pH.

Неподвижная фаза: катионообменник на основе силикагеля; элюент: натрий-цитратный буфер, ионная сила 0,1.

которая проводится после разделения [81, 82]. Для ВЭЖХ, однако, реакция с нингидрином не пригодна, так как протекает слишком медленно, что приводит к уширению пиков, поэтому в ВЭЖХ для обнаружения применяют иные принципы и реакции [83—86]. Применение механически прочных ионообменников для разделения и высокочувствительных и селективных реакций для обнаружения позволяет проводить весьма эффективное разделение аминокислот и пептидов, содержащихся, например, в моче. Нижний предел обнаружения при помощи реакции с фталевым альдегидом (детектор по флуоресценции) составляет несколько пикомолей [86]. На рис. 2.25 показано хроматографическое разделение аминокислот мочи человека. Объем анализируемой пробы составлял 25 мкл; какой-либо предварительной обработке проба не подвергалась. Выбранная хроматографическая система позволяет проводить разделение и обнаружение всех находящихся в моче соединений, содержащих первичную аминогруппу.

2.2.7. Градиентное элюирование

На силикагелевых неподвижных фазах при помощи обращенно-фазовой или ионообменной хроматографии в изократическом режиме хорошо разделяются только такие соединения, которые значительно отличаются друг от друга по полярности. Разделение неполярных соединений или соединений с близкой полярностью можно провести при программируемом изменении элюирующей способности элюента или, иными словами, при

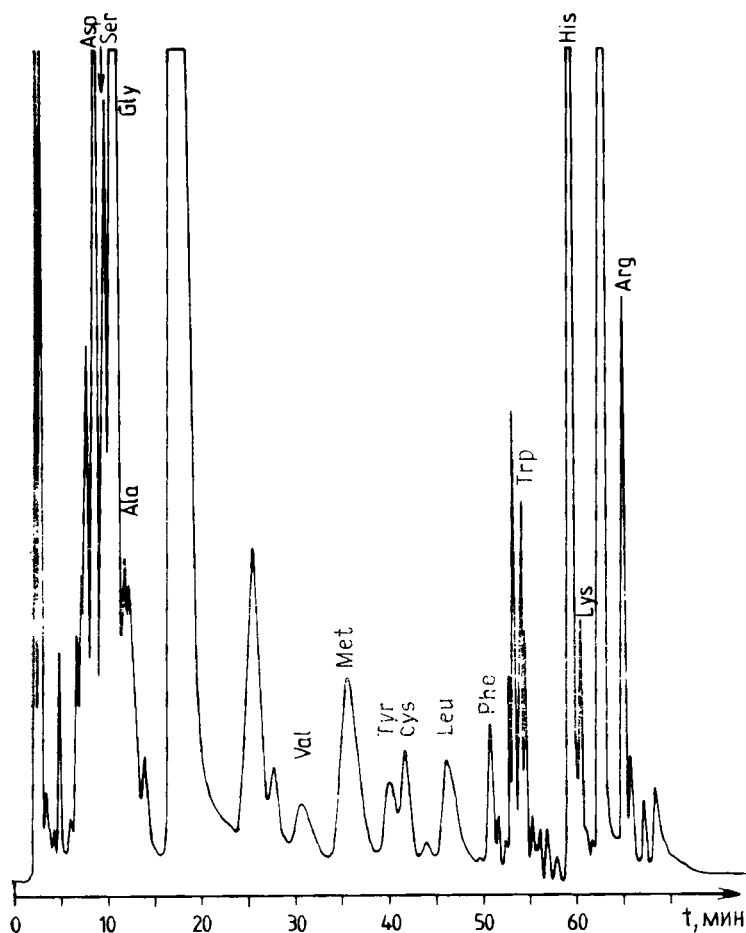


Рис. 2.25. Определение аминокислот в моче человека при градиентном элюировании и обнаружении на основе химической реакции.

Неподвижная фаза: ионообменник на основе силикагеля; элюент: А — цитрат лития, рН 2,0, $I=0,1$ М, В — цитрат лития, рН 7,5, $I=0,1$ М; программирование состава элюента: от 0 до 50 мин, повышение концентрации компонента В от 5 до 35%, последующее повышение объемной скорости 1,0 мл/мин, далее от 50 до 55 мин, последующее повышение концентрации В при объемной скорости 2,0 мл/мин, после 55 мин 100% В, $I=0,5$, объемная скорость 2,0 мл/мин; обнаружение: по реакции с фталевым ангидридом в боратном буфере, рН 10,0; реактор; трубка $900 \times 0,05$ см (внутр. диаметр); объемная скорость реагента: 1,0 мл/мин; время реакции: 40–60 с, температура реакции: 30°C .

градиентном элюировании, которое позволяет также существенно уменьшить длительность разделения и ширину пиков. Однако разделение зон при градиентном элюировании всегда несколько хуже, чем при изократическом [2, 87], но это не представляет собой проблемы, так как разделение зон остается на достаточно высоком уровне.

Отметим следующие возможности оптимизации условий градиентного элюирования (не учитывая выбор неподвижной фазы): состав элюента в начале разделения, форма градиента, состав элюента в конце разделения, объемная скорость, программирование времени.

2.2.7.1. Выбор условий градиента. Выбор неподвижной фазы определяется свойствами разделяемой смеси. Выбор компонентов элюента и их соотношение в начале и конце элюирования зависит от различия в полярности разделяемых соединений. Выбор оптимальных условий градиентного элюирования позволяет получить хорошее разрешение пиков, элюирующихся первыми, а также уменьшить до разумных пределов длительность элюирования наиболее сильно удерживаемых компонентов.

Изменение концентрации компонента элюента во времени может представлять собой прямую либо выпуклую или вогнутую кривую. Линейная форма градиента предпочтительна особенно в ВЭЖХ и ИОХ. Реальная (эффективная) форма градиента лишь отчасти зависит от той формы, которая задается программой. Форма градиента представляет собой функцию, зависящую от различия в элюирующей способности двух компонентов элюента. Если два растворителя существенно отличаются по элюирующей способности (полярности), то добавление небольшого количества одного из них (например, полярного) к другому вызывает сильное изменение элюирующей способности, соответственно форма градиента будет иметь вид выпуклой кривой. Такую форму выбирают относительно редко, так как в этом случае в начале разделения пики на хроматограмме будут находиться очень близко друг от друга.

Линейное увеличение элюирующей способности представляется оптимальным для разделения соединений одного гомологического ряда: в этом случае соединения элюируются примерно через одинаковые интервалы, причем ширина пиков меняется незначительно. Это обеспечивает примерно одинаковый предел обнаружения для всех компонентов разделяемой смеси. В обращенно-фазовой хроматографии линейное увеличение элюирующей силы осуществляют путем линейного увеличения содержания органического компонента, например метанола или ацетонитрила, в воде. На рис. 2.26 на примере фенилациловых эфиров жирных кислот показано влияние увеличения элюирующей способности элюента при градиентном элюировании. При введении в элюент метанола расстояние между пиками жирных кислот, расположенных рядом в одном гомологическом ряду, постепенно уменьшается с увеличением элюирующей способности элюента. В то же время при элюировании элюентом, в который вводится ацетонитрил, расстояния между пиками примерно

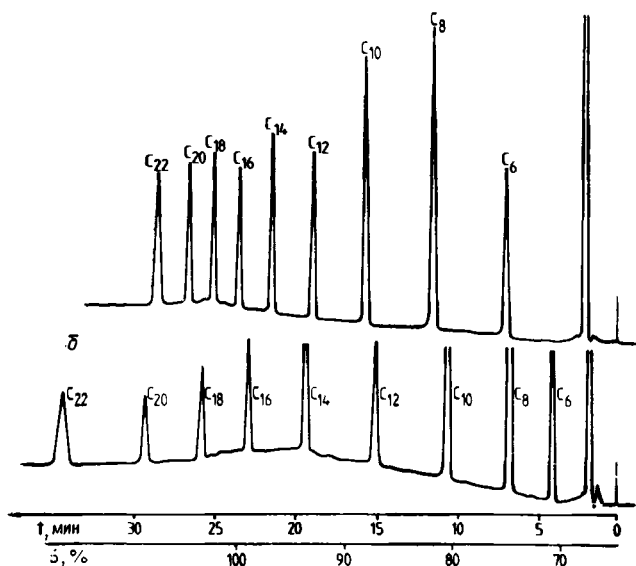


Рис. 2.26. Разделение фенацеловых эфиров жирных кислот в условиях линейного градиента элюирующей способности элюента [117].

Градиент: от 70 до 100% Б; градиентный объем: 40 мл. а: Б — метанол; б: Б — ацетонитрил.

одинаковы. В начале элюирования (при высоком содержании компонента Б) расстояние между пиками несколько меньше, тогда как на последних этапах элюирования (после достижения конечной концентрации добавки) оно вновь увеличивается. Если в качестве органического компонента используется более сильный элюент, например пропанол, общая элюирующая способность увеличивается таким образом, что кривая элюирования имеет, по крайней мере вначале, выпуклую форму. В ионообменной хроматографии, где используют градиент рН или ионной силы, настоятельно рекомендуется линейная форма градиента. Если основу неподвижной фазы составляет силикагель, а градиент формируют, добавляя гексан или дихлорметан, то линейное увеличение элюирующей способности можно получить, используя слегка вогнутый градиент. После выбора формы градиента и условий его формирования необходимо оптимизировать объемную скорость и программирование времени. Произведение этих переменных или градиентный объем V_g представляет собой объем элюента, прошедшего через систему в процессе программируемого разделения.

2.2.7.2. Концепция градиентного объема. Если градиентный объем сохраняется постоянным, то независимо от изменения объемной скорости и длительности разделения определенные

компоненты разделяемой смеси элюируются при вполне определенном и постоянном для конкретного компонента составе элюента [88], являющегося функцией градиентного объема. Чем больше градиентный объем, тем меньше содержание компонента Б в элюенте, при котором элюируется определенный компонент. Градиентный объем для обычной аналитической колонки (длина 25—30 см, внутренний диаметр 0,4 см) не может быть менее 10 мл или, если его выразить в объемах пустой колонки, примерно 2,5 объема пустой колонки. Число компонентов, которые можно разделить при таком сравнительно малом градиентном объеме, также мало. Если колонка заполнена частицами размером 10 мкм, допустимое число компонентов смеси равно примерно 30. Для разделения многокомпонентной смеси необходимы существенно большие градиентные объемы, равные 30 объемам пустой колонки. В такой системе несложно разделить смесь, состоящую из 100 компонентов. При оптимальной объемной скорости, например 2 мл/мин, время разделения смеси из 100 компонентов составляет 60 мин. При градиентном объеме, равном 10—15 объемам пустой колонки, можно разделить смесь из 70 компонентов.

Объем, соответствующий выходу того или иного пика, зависит от объемной скорости. Особенности хроматографического оборудования ограничивают минимальное значение объемной скорости. Скорость, равную 2 мл/мин, считают оптимальной, при меньшей скорости точность работы насосов недостаточна. Увеличение объемной скорости от 1 до 2 мл/мин уменьшает объем фракций, соответствующих пикам (при постоянном градиентном объеме) на 10%, однако длительность анализа уменьшается вдвое. При объемной скорости более 4 мл/мин возникают проблемы, связанные с невоспроизводимостью результатов, смешиванием компонентов элюента при создании градиента.

Используя понятие «градиентный объем», можно достаточно быстро определить оптимальный состав элюента для изократического элюирования. С этой целью необходимо установить состав элюента, при элюировании которым проба при заданном градиентном объеме вымывается из колонки за один цикл. При этом следует учитывать, что вследствие наличия мертвого объема в системе в целом и непосредственно в хроматографической колонке эффективный состав элюента на выходе из колонки всегда немного (на несколько миллилитров) отличается от показываемого приборами. Способ определения состава элюента на выходе из колонки обсужден в разд. 2.2.7.3. Если для изократического элюирования использовать элюент такого состава, при котором определенный пик вымывается за один цикл, коэффициент емкости равен примерно 1 (если градиентный объем составляет примерно 5—15 объемов пустой колон-

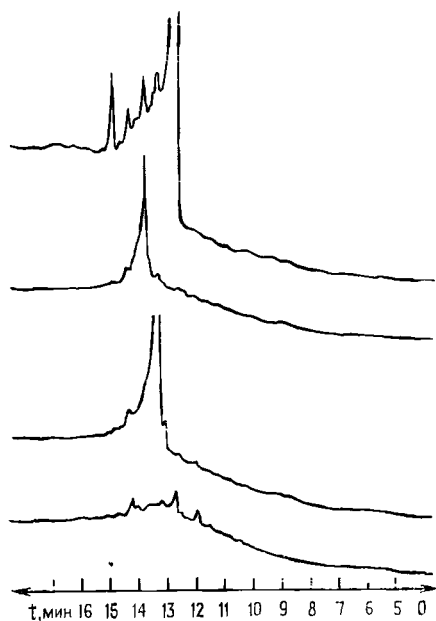


Рис. 2.27. Холостой опыт по градиентному элюированию в условиях обращенно-фазовой хроматографии с различными партиями коммерческого метанола (неподвижная фаза C_{18}).

ки). Более высокое значение k наблюдается при больших градиентных объемах.

2.2.7.3. Практические аспекты градиентного элюирования.

Хроматографическое оборудование для градиентного элюирования обсуждается в разд. 2.3. Особые требования предъявляют к чистоте растворителей. Разделяющая колонка служит своеобразным коллектором примесей, содержащихся в растворителях, которые могут элюироваться в виде четких пиков, чаще всего на завершающих этапах программируемого изменения состава элюента, что может служить причиной ошибочной трактовки хроматографических данных. Поэтому перед разделением целесообразно провести холостой опыт, т. е. градиентное элюирование без введения в колонку пробы. Рис. 2.27 иллюстрирует данные таких экспериментов, осуществляемых с использованием различных партий метанола [88]. На колонке удерживаются не только те примеси, которые содержатся в стартовом (более слабом) компоненте элюента, но и примеси, содержащиеся во втором, более сильном компоненте, причем последние элюируются на заключительном этапе разделения. Количество сорбированных примесей зависит также от времени, в течение которого после завершения одного цикла и перед началом другого через колонку прокачивают элюент, поэтому это время следует поддерживать постоянным. Кроме того, холостое гра-

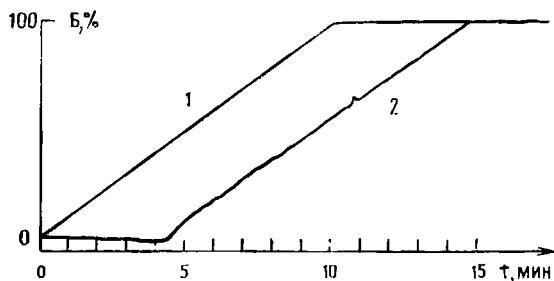
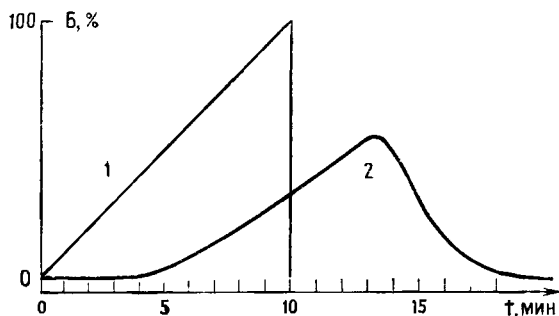


Рис. 2.28. Контрольные эксперименты по формированию профиля градиента при помощи двух видов коммерческого оборудования.

1 — профиль, полученный на основании данных электронного датчика; 2 — истинный профиль градиента на выходе из колонки.

диентное элюирование необходимо повторять в тех случаях, когда меняется партия растворителя.

Регенерация колонки, т. е. восстановление в ней начальных условий путем удаления полярного компонента элюента, при использовании неподвижной фазы на основе силикагеля требует длительного времени. Регенерация колонок, заполненных химически привитыми фазами, достигается после пропускания через нее по крайней мере 10 объемов элюента, равных объему пустой колонки. Время регенерации также должно быть стандартизовано из-за возможного концентрирования в колонке примесей, содержащихся в воде или метаноле.

В целях проверки работы оборудования и определения таких параметров, как действительный профиль градиента, запаздывание градиента, обусловленное наличием мертвого объема, состав элюента на выходе из колонки, рекомендуется следующая методика.

Хроматографическую систему, включая колонку, следует привести в рабочее состояние. В качестве компонента А элюента следует использовать чистый метанол, а компонента Б — метанол, содержащий примерно $1 \cdot 10^{-2} \%$ толуола в качестве УФ-метки. Концентрация толуола выбрана так, чтобы при стандартном диапазоне чувствительности УФ-детектора (0—0,5 ед. поглощения всей шкалы) можно было наблюдать градиент в интервале 0—100% компонента Б. На рис. 2.28 приведены

градиенты, полученные при помощи двух различных типов промышленного хроматографического оборудования. Внизу показан типичный градиент высокого давления создаваемый с применением двух насосов, сверху — градиент низкого давления, формируемый с использованием одного насоса и смесительной камеры до ввода элюента в насос (в последнем случае происходит деформация заданной формы градиента). Из этого рисунка можно определить запаздывание градиента в колонке. Конечная программируемая концентрация на выходе из колонки еще не достигнута (т. е. разделение и элюирование еще не завершены), а приборы уже ее фиксируют. Стартовая точка, фиксируемая УФ-детектором, соответствует 0% компонента Б на выходе из колонки, конечная — 100% компонента Б, следовательно, расстояние между этими точками равно интервалу от 0 до 100%. Исходя из этого, можно определить состав элюента на выходе из колонки. Найденная концентрация элюента при условии соответствия градиентного объема требуемому может быть использована для выбора оптимального состава элюента для изократического элюирования.

2.2.8. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

Гель-проникающая хроматография в отличие от рассмотренных ранее видов хроматографии имеет в своей основе единый, не допускающих других трактовок механизм разделения. В отсутствие специфических взаимодействий пробы и неподвижной фазы (что соответствует определению метода) порядок элюирования во всех случаях является функцией размера молекул. Для синтетических неразветвленных полимеров, существующих в растворе в виде статистического клубка, размеры молекул можно непосредственно связать с молекулярной массой. Для молекул с упорядоченной структурой обычно используемая зависимость десятичный логарифм молекулярной массы — объем элюирования не вполне описывает их хроматографическое поведение в условиях ГПХ.

ГПХ называют также гель-фильтрацией или гель-эксклюзионной хроматографией. Получаемые на основе сшитых полимеров гели, чья пористая структура формируется в процессе набухания в элюенте, непригодны для ВЭЖХ. Структура насадки и, следовательно, пористая структура зависят от степени сшитости геля и состава элюента. При объемных скоростях, обычно используемых в ВЭЖХ, насадки и мягкие гели сжимаются. Поэтому в современной ВЭЖХ применяются полужесткие органические гели и прочные неподвижные фазы на основе силикагелей с частицами малого диаметра. Рис. 2.29 демонстрирует на примере разделения декстранов преимущества современной ГПХ над гель-фильтрационной хроматографией. Приме-

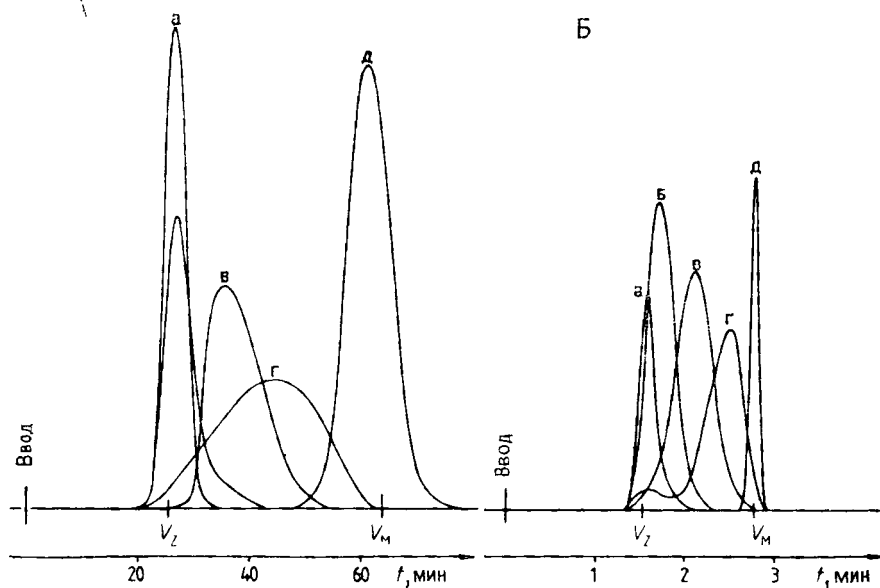


Рис. 2.29. ГПХ на мягких гелях и на силикагеле.

А — неподвижная фаза: сефадекс G 50 (тонкодисперсный); колонка: 37,1×2,1 см; объемная скорость: 2 мл/мин; элюент: вода; проба: декстраны молекулярной массы 70 000 (а), 40 000 (б), 10 000 (в), 5000 (г) и ксилроза (д).
Б — неподвижная фаза: кизельгель Si 100 (10 мкм); колонка 25×0,41 см; объемная скорость: 1 мл/мин; элюент и проба те же.

нение механически прочных силикагелей с частицами малого диаметра уменьшает время разделения примерно в 20 раз, а скорость разделения (число теоретических тарелок в секунду) на неподвижных фазах на основе силикагеля увеличивается в 400 раз.

2.2.8.1. Основы ГПХ. Объем элюирования V_e полимера должен зависеть не только от размера его молекул в растворе, но и от характера распределения пор неподвижной фазы по размерам. Мертвый объем колонки V_M определяют как объем элюирования молекул элюента или иного низкомолекулярного соединения, не взаимодействующего с поверхностью неподвижной фазы, но проникающего во все ее поры, включая поры наименьшего диаметра. Методы определения V_M и t_M приведены в табл. 2.2 (разд. 2.1.3). Объем V_M состоит из объема между частицами неподвижной фазы V_z и объема пор V_p неподвижной фазы. V_z определяют как удерживаемый объем полностью исключаемых молекул с большой средней молекулярной массой, не проникающих в поры и идентичных по свойствам разделяемым молекулам. В зависимости от характера распределе-

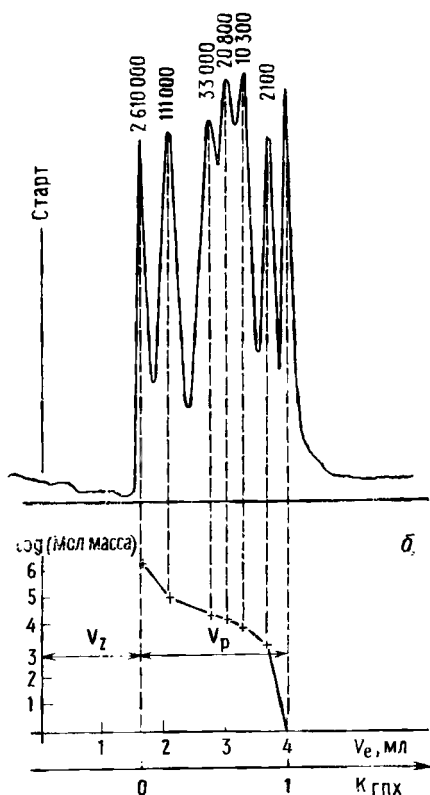


Рис. 2.30. Пример разделения методом ГПХ полистиролов с молекулярной массой от 2100 до 2 600 000 (наименьшей молекулой служил бензол) (а) и градуировочная кривая, построенная по результатам указанного разделения (б) [2].

Неподвижная фаза: силикагель; элюент: дихлорметан.

ния пор неподвижной фазы по диаметрам и размера молекул разделяемого вещества доступной для последнего может быть только часть пор. Объем элюирования компонента разделяемой смеси равен

$$V_e = V_z + K_{\text{ГПХ}} V_p \quad (11)$$

где $K_{\text{ГПХ}}$ — коэффициент, отражающий долю (часть) объема пор, доступных данному компоненту смеси. Согласно определению, $K_{\text{ГПХ}}$ не превышает единицы ($0 \leq K_{\text{ГПХ}} \leq 1$). Таким образом, объем элюирования меньше или равен V_M , поэтому момент окончания процесса разделения всегда можно предсказать. Напротив, в хроматографии, в основе которой лежит принцип удерживания, объем элюирования V_R удерживаемого соединения больше V_M ($V_R = V_M(1+k)$). На рис. 2.30 показаны соотношения V_e , V_z и V_p и $\lg M_w$, характеризующие распределение пор в неподвижной фазе по диаметрам [27].

Разрешение пиков в ГПХ (как и в хроматографии на основе удерживания) зависит от эффективности колонки и выражается

числом теоретических тарелок при заданной объемной скорости. Чем меньше наклон прямой в координатах $\lg M_w - V_e$, тем лучше разрешение (ΔV_e или $\Delta K_{ГПХ}$) двух пиков, соответствующих соединениям с близкой молекулярной массой. Третий важный параметр, от которого зависит разрешение, — соотношение между объемом пор (объем, где происходит разделение) и объемом между частицами (где разделения не происходит). Разрешение R пиков 1 и 2 рассчитывается следующим образом:

$$R = \frac{1}{4} \frac{V_p}{V_z} \frac{K_{ГПХ,2} - K_{ГПХ,1}}{1 + K_{ГПХ,2} V_p/V_z} \sqrt{n_2} \quad (12)$$

Сравнительный анализ данных, приведенных на рис. 2.29, с использованием выражения (12) показывает, что лучшее, чем на силикагеле, разрешение, достигаемое на сефадексе, обусловлено большим соотношением V_p/V_z («соотношение емкости») — соответственно 1 и 0,8. Большая эффективность n , достигаемая на колонке с силикагелем (маленькие частицы), компенсируется меньшим соотношением V_p/V_z .

2.2.8.2. Неподвижные фазы. Для оптимизации процесса разделения по методу ГПХ необходимы данные о среднем диаметре пор неподвижной фазы, распределении пор по диаметрам, а также об эффективном объеме пор. Механически прочные неподвижные фазы используются как с водными, так и с органическими элюентами, их пористая структура при этом не меняется. Характеристики неподвижных фаз определяют при помощи универсального метода ГПХ, используя полистирольные стандарты [27, 77], преимущество которых — доступность их в виде фракций узкой дисперсности ($P < 1,1$). На рис. 2.31 приведены градуировочные кривые, полученные для ряда силикагелей с применением полистиролов, которые демонстрируют приемлемость метода и необходимый средний диаметр пор для заданного интервала молекулярных масс. Такие градуировочные кривые можно получить с любым другим полимером, если он доступен в виде узких фракций с разными молекулярными массами, растворимых в выбранных элюентах, и если он не сорбируется на неподвижной фазе и не вступает с ней в специфические взаимодействия. Многие водорастворимые полимеры взаимодействуют с силанольными группами, находящимися на поверхности силикагеля. Ряд фирм поставляет силикагели с модифицированной поверхностью, пригодные для биохимического анализа [89].

Модификация силикагелей осуществляется обработкой гликолями, ацетиламинопропилсиланами и гидроксिलированными силанами. Такие силикагели поступают в продажу под названиями лихросфер диол, синхропак GPC, TSK SW, уотерс I-125, аквопор и т. д. [89—93].

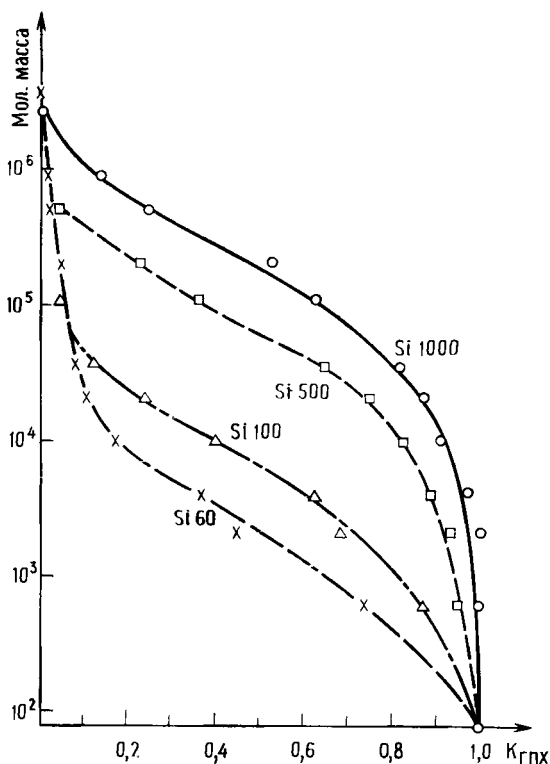


Рис. 2.31. Градуировочные кривые, полученные для различных силикагелей.

Неподвижные фазы: лихросорб Si 60, Si 100, Si 500, Si 1000; элюент: дихлорметан; проба: полистиролы.

В водных элюентах градуировку проводят декстранами, сульфированными полистиролами, полиэтиленгликолями, а также различными белковыми стандартами. При применении водорастворимых полимеров и неподвижных фаз на основе силикагеля следует убедиться, что сорбция на поверхности силикагеля исключена.

2.2.8.3. Оптимизация условий разделения при помощи ГПХ.

Как уже указывалось выше, оставшиеся немодифицированными поверхностные силанольные группы могут влиять на удерживание, особенно при элюировании водными растворами. Ионное взаимодействие неподвижной фазы с кислотными или основными компонентами пробы влияет на их время удерживания (разд. 2.2.4.1). Такие эффекты можно наблюдать и в ГПХ, в первую очередь при разделении белков. Отклонение от предсказанного порядка элюирования может наблюдаться также потому, что даже химически модифицированные фазы с короткими алкильными и полимерными группами обладают некоторыми гидрофобными свойствами.

Рассмотрим два различных типа ионных взаимодействий белков с неподвижной фазой.

а. Белки, заряженные положительно в использованном буферном растворе ($pI > pH$), удерживаются по ионообменному механизму, и V_e в данном случае выше, чем можно было бы ожидать, исходя из размера их молекул.

б. Белки, заряженные отрицательно в использованном буферном растворе, не могут проникнуть в поры, поскольку этому препятствует наличие доннановского потенциала [63], и элюируются раньше, чем можно было бы ожидать.

Заряд белков меняют, варьируя pH буферного раствора. Однако если ферментативную активность их необходимо сохранить, то такой способ оптимизации условий разделения имеет ограниченное применение.

Ионное взаимодействие уменьшают, пользуясь законом действующих масс, путем добавления в буфер нейтральных солей. Этот же прием используют в ИОХ (разд. 2.2.6.2). Рис. 2.32 демонстрирует влияние ионной силы элюента на разделение различных белков. Увеличение ионной силы до 0,3 достаточно для подавления ионо-эксклюзионного эффекта. При таком значении ионной силы отрицательно заряженные белки элюируются в соответствии с их молекулярными размерами. Для снижения ионообменного взаимодействия положительно заряженных белков с неподвижной фазой необходимо, чтобы ионная сила элюента равнялась примерно 0,5. Однако следует заметить, что увеличение ионной силы вызывает увеличение удерживания гидрофобных соединений (см. трипептид $(Phe)_3$ и динитрофенилаланин на рис. 2.32). Кроме того, как уже отмечалось выше, увеличение ионной силы приводит к высаливанию гидрофобных соединений. Обсуждаемые изменения состава элюента, позволяющие уменьшить ионное взаимодействие с неподвижной фазой, приемлемы для ГПХ на силикагелях [90].

Биохимикам хорошо известно, что белки денатурируют при изменении pH , высаливании, а также в результате гидрофобного взаимодействия. Поэтому выбирать условия хроматографического разделения следует очень тщательно и при замене колонки проверять их. Если разделение проводится в указанных выше условиях, выход белков всегда превышает 90% даже при небольшом их запаздывании. Ионное взаимодействие наблюдается также при разделении белков гель-фильтрацией на сефадексе, поскольку на его поверхности могут содержаться карбоксильные группы [94]. Отметим в заключение, что ионная сила элюента не должна значительно превышать 0,5 [90].

2.2.8.4. Корреляция между объемом элюирования, молекулярной массой и молекулярными размерами. Одно из преимуществ колоночной ГПХ на силикагеле заключается в том, что

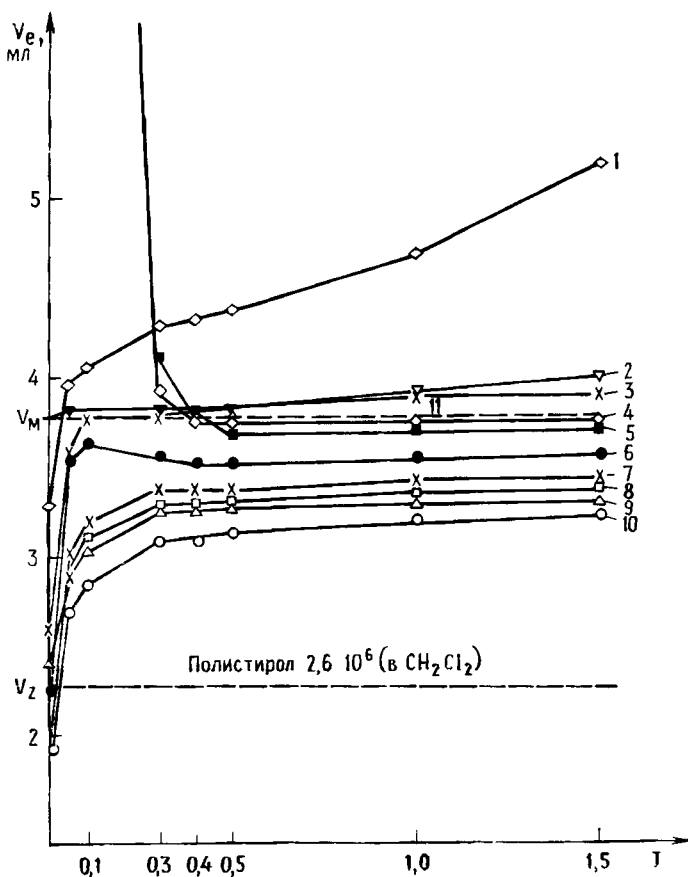


Рис. 2.32. ГПХ пептидов и белков: зависимость объема элюирования от ионной силы [92].

Неподвижная фаза: с привитыми амидными группами; элюент: 0,1 М трис-НСl-буфер, рН 7,5; ионную силу изменяли путем добавления NaCl.
 1 — трифениламин; 2 — динитрофенилаланин; 3 — фецилаланин; 4 — химотрипсिनоген; 5 — цитохром с; 6 — миоглобин; 7 — овальбумин; 8 — BSA; 9 — каталаза; 10 — ферритин; 11 — бензол.

элюент не влияет ни на диаметр пор силикагеля, ни на их объем. Поэтому можно отградуировать колонку при помощи полистирольных стандартов, элюируя их дихлорметаном, а затем проводить на этой колонке разделение белков или водорастворимых полимеров, элюируя их водой или водными буферными растворами.

Если полимеры существуют в растворе в виде статистических клубков, то размеры последних определяются относительной молекулярной массой полимеров [95], а также степенью их

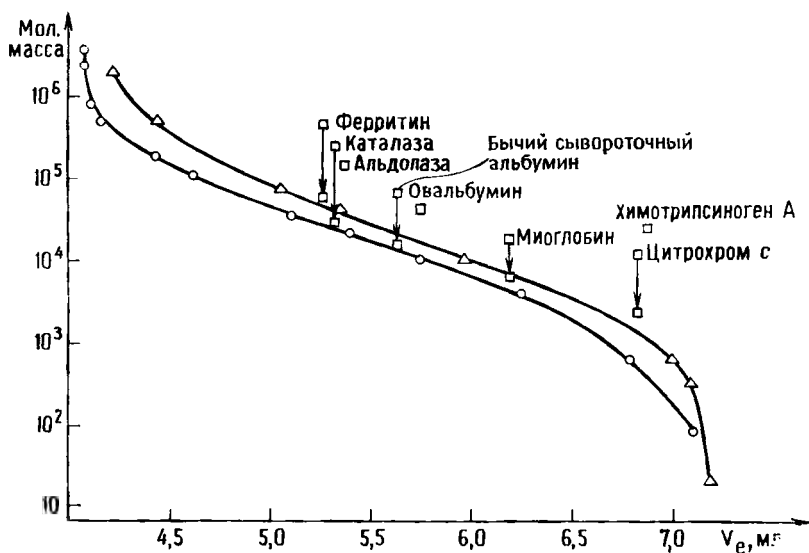


Рис. 2.33. Корреляция между объемами элюирования белков и полистиролов (объяснения см. в тексте) [92].

сольватации. Для получения универсальной градуировочной кривой в химии полимеров рекомендуется умножить молекулярную массу полимера на его характеристическую вязкость, что позволяет учесть различие в степени сольватации [96].

На рис. 2.33 приведены градуировочные кривые, полученные для колоночной системы с модифицированным силикагелем с использованием полистирольных стандартов (элюент — дихлорметан), декстранов (вода) и белков (буферный раствор). Корректировка, учитывающая различие в молекулярной структуре стандартов, в данном случае не проводилась. Декстраны отличаются гораздо большей плотностью, чем полистиролы идентичной молекулярной массы, т. е. объем статистического клубка молекулы декстрана намного меньше, и, следовательно, их объем элюирования больше. Белки существуют в растворе в различной форме, определяемой последовательностью аминокислот. Третичная (надмолекулярная) структура белков гораздо более компактна, чем структура статистического клубка. Белки элюируются при большем V_e , чем полистиролы или декстраны такой же молекулярной массы [92]. Молекула миоглобина, молекулярная масса которого относительно невелика (17 800), имеет форму эллипсоида с большей осью 4,4 нм. Такие же размеры имеет молекула полистирола с молекулярной массой 6700, существующая в форме статистического клубка [27]. Если провести корректировку молекулярной массы белков

с учетом их размеров, то градуировочная кривая по белкам практически совпадает с таковой по полистиролам (указано стрелками на рис. 2.33). Этот факт подтверждает, что специфическое удерживание белков на неподвижной фазе отсутствует и что их разделение проходит по механизму гель-проникающей хроматографии. Следует отметить, что ГПХ используют и для решения обратной задачи: определения стоксова радиуса неизвестных белков по градуировочной кривой для полистиролов [97]. Белки, имеющие одинаковую молекулярную массу, могут иметь различную геометрию надмолекулярной структуры и поэтому отличаться по объему элюирования.

2.2.9. Неподвижные фазы, имеющие функциональные группы

Силикагель реагирует с алкилсиланами, а также с силанами, имеющими функциональные группы на органической «ножке», соединенной с атомом кремния. Введение функциональных групп в уже привитые к поверхности органосиланы затруднено и никогда не дает неподвижных фаз с хорошими воспроизводимыми свойствами [98]. Оценить, какой специфический вид селективности приобретает неподвижная фаза после введения функциональных групп, очень трудно. Все привитые фазы гидрофобны. Привитые фазы, гидрофобность которых после введения функциональных групп снижается, используются как неподвижные фазы в ГПХ в сочетании с водными элюентами. На неподвижных фазах с привитыми N-ацетиламинопропильными или глицидилоксипропильными группами проводят разделение методом ГПХ белков (разд. 2.2.8). Очень сильное взаимодействие разделяемых соединений с функциональными группами неподвижной фазы характерно для ИОХ (разд. 2.2.6). На примере этих систем можно также показать, как гидрофобность неподвижной фазы влияет на удерживание при наличии сильного ионного взаимодействия.

В данном случае легко установить различие между ожидаемой и действительной селективностью. Для других функциональных групп обнаружить селективность гораздо сложнее, поскольку трудно получить идентичное покрытие поверхности неподвижной фазы при ее модифицировании соответствующими силанами. Различие в гидрофобной селективности, в степени модифицирования поверхности и соответственно в концентрации силанольных групп осложняет непосредственное сопоставление свойств неподвижной фазы и вида привитых функциональных групп. Селективность неподвижных фаз, например с цианопропильными или фенильными привитыми группами обусловлена не только наличием этих групп, но и различием в гидрофобности, полярности и (или) степени покрытия поверхности.

Очень трудно объяснить, чем это вызвано, но неподвижные фазы с привитыми аминокруппами, выпускаемые различными поставщиками, обладают сходными свойствами, тогда как нитрильные фазы очень различаются [99]. Сравнивать свойства различных привитых фаз или описывать их поведение при использовании различных элюентов не имеет смысла. В хроматографии оценивается селективность всей хроматографической системы в целом, т. е. неподвижной фазы, элюента и разделяемых соединений [32].

Поэтому ниже будут приведены только такие примеры применения неподвижных фаз с привитыми функциональными группами, в которых очевидна взаимосвязь селективности и вида функциональной привитой группы.

2.2.9.1. Фазы, участвующие в переносе заряда. Разделение ароматических углеводов проводят на неподвижных фазах с привитыми нитрофенильными [2, 100], нитрофтореноновыми и тетрахлорфталиевыми кислотными [101] группами. При элюировании неполярными элюентами такие неподвижные фазы по селективности превосходят немодифицированный силикагель.

2.2.9.2. Аминофазы. Селективность неподвижных фаз с привитыми пропиламиногруппами при разделении ароматических углеводов путем элюирования неполярными элюентами существенно отличается от селективности немодифицированных силикагелей [2, 102]. В воде аминофазы проявляют свойства слабого анионообменника, тогда как в водно-ацетонитрильных смесях вполне пригодны для разделения сахаров [103, 104]. На рис. 2.34 приведен пример разделения сахаров и их спиртов на аминофазе. Разделение происходит по распределительному механизму [105], и поэтому аминокруппы не принимают непосредственного участия в удерживании сахаров. Неподвижная фаза обогащается водой из элюента, разделение происходит в результате распределения разделяемых соединений между обогащенной водой фазой и элюентом. По такому же механизму происходит разделение сахаров на ионообменных смолах при элюировании водным раствором метанола [80]. Если к неподвижной фазе привиты диаминогруппы, содержание воды внутри неподвижной фазы увеличивается от 0,13 (моноаминогруппы) до 0,23 г/г. Если разделение проводится на диаминовой фазе, содержание воды в элюенте должно быть выше, чтобы коэффициент емкости имел то же значение, что и для моноаминофазы. Увеличение содержания воды в элюенте способствует разделению, поскольку увеличивает растворимость сахаров.

На рис. 2.35 приведена зависимость коэффициента емкости от концентрации ацетонитрила в элюенте для моно-, ди- и триаминофаз. Модифицирование неподвижной фазы силаном,

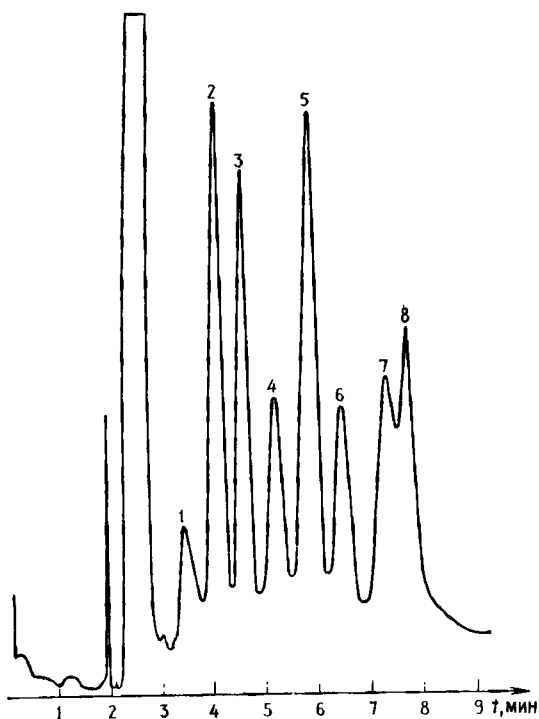


Рис. 2.34. Разделение сахаров и их спиртов на привитой аминофазе [105].

Неподвижная фаза: аминосила на лихросорбе Si 100; элюент: ацетонитрил/вода (80/20 по массе).

1 — дезоксирибоза; 2 — рамноза; 3 — мезозритроза; 4 — арабиноза; 5 — фруктоза; 6 — манноза; 7 — сорбитоза; 8 — маннитоза.

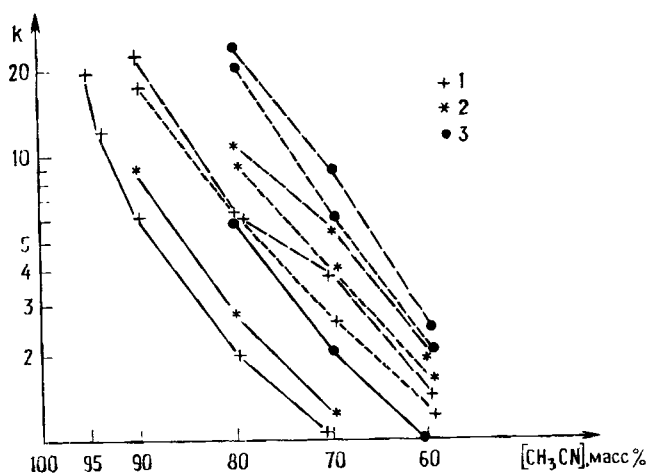


Рис. 2.35. Сравнение различных аминофаз на примере удерживания фруктозы (1), глюкозы (2), сахарозы (3).

Неподвижная фаза: — амино, - - - - - диамино, — — — триамино; элюент: вода/ацетонитрил.

содержащим три аминогруппы, оказывает лишь незначительное дополнительное влияние на увеличение содержания воды в неподвижной фазе, а следовательно, и на разделение сахаров [105].

Диаминофаза, будучи слабым ионообменником, используется для разделения полиэтиленгликолей при элюировании водой [91]. Следует отметить, что полиэтиленгликоли прочно удерживаются не только обращенной фазой, но и немодифицированным силикагелем [98]. Неподвижные фазы для ГПХ белков, например с привитыми амидными или гликолиевыми группами, также прочно удерживают полиэтиленгликоли. Приведенный пример — еще одно свидетельство того, что селективность неподвижной фазы зависит от целого ряда хроматографических условий и взаимодействия элюента и разделяемых соединений с неподвижной фазой.

2.2.9.3. Хиральные фазы. Проблема разделения оптических изомеров при помощи жидкостной хроматографии обсуждается с момента разработки этого метода. В работе [106] рассмотрены примеры успешного и воспроизводимого разделения энантиомеров на мягких гелях. По размеру использованных колонок эти примеры соответствуют препаративному разделению, однако если исходить из количества образца, наносимого в расчете на грамм неподвижной фазы (10^{-3} г/г), то их можно отнести к примерам аналитического разделения. Длительность разделения и разбавление пробы в ходе разделения были значительными из-за большого диаметра частиц неподвижной фазы. В литературе описано также успешное разделение энантиомеров в органическом элюенте на ацетилцеллюлозе [107].

Высокая эффективность разделения энантиомером достигнута на привитых фазах на основе силикагеля [108, 109]. При использовании неводных элюентов были успешно разделены энантиомерные сульфоксиды, амины, аминокислоты, спирты, гидроксикислоты и т. д.

Разделение аминокислот и их производных проводят на хиральных неподвижных фазах, представляющих собой органические полимерные носители [110] или силикагели [111—116] с привитыми аминокислотами. Элюирование проводят смесью вода/ацетонитрил или водой. Необходимым условием является наличие в составе элюента и на неподвижной фазе атомов соответствующих металлов, например меди. На рис. 2.36 приведен пример хирального разделения свободных аминокислот. Эффективность таких колонок относительно невелика из-за медленного массопереноса при лигандообменных процессах. Коэффициент емкости в значительной степени зависит от содержания меди, состава элюента, температуры и, конечно, привитой аминокислоты. Кроме энантиомерного разделения аминокислот, в лите-

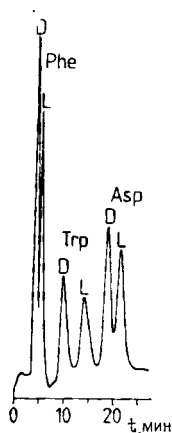


Рис. 2.36. Хиральное разделение свободных аминокислот.

Неподвижная фаза: силикагель с привитым хиральным пролином; элюент: $7 \cdot 10^{-4}$ М водный раствор CuSO_4 ; температура: 35°C .

ратуре описано разделение барбитуратов и других лекарственных средств [116].

2.2.10. Выбор разделительной системы

В предыдущих разделах были обсуждены основы различных механизмов разделения. В настоящее время фирмы-поставщики выпускают более 100 названий неподвижных фаз. Безусловно, некоторые из них очень близки по свойствам, хотя и называются по-разному. Селективность обращенных и привитых фаз, как и селективность фаз на основе силикагеля, зависит от их физических свойств и характеристик поверхности. Неудивительно поэтому, что получение неподвижных фаз с воспроизводимыми характеристиками — задача достаточно сложная.

Свойства неподвижных фаз могут меняться от партии к партии. Кроме того, неподвижные фазы одного названия, выпускаемые различными фирмами, также могут существенно различаться.

Начинающим хроматографистам целесообразно выбирать разделительную систему исходя из механизма разделения, поскольку многие примеры разделения описаны в справочниках по классической колоночной жидкостной хроматографии [118—120]. В первую очередь следует изучить именно ту литературу, которая цитируется в этих справочниках.

Схема выбора разделительной системы в соответствии с растворимостью пробы приведена на рис. 2.37. Располагая определенной информацией о составе разделяемой смеси и структуре входящих в эту смесь соединений, можно составить некоторое представление об «оптимальной» системе (табл. 2.5).

Следует отметить, что хроматографическую систему необходимо рассматривать всю в целом, т. е. неподвижную фазу, элюент и разделяемые соединения. На рис. 2.38 показано, что время удерживания двух водорастворимых нейтральных полимеров (декстранов) на неподвижной гликолевой фазе составляет менее t_M . Это означает, что разделение происходит по механизму ГПХ. Полимерный же стандарт (полиэтиленгликоль 600) удерживается и частично разделяется на его полимолекулярные компоненты.

Выбор конкретной разделительной системы зависит также от цели, которую преследуют при разделении тех или иных

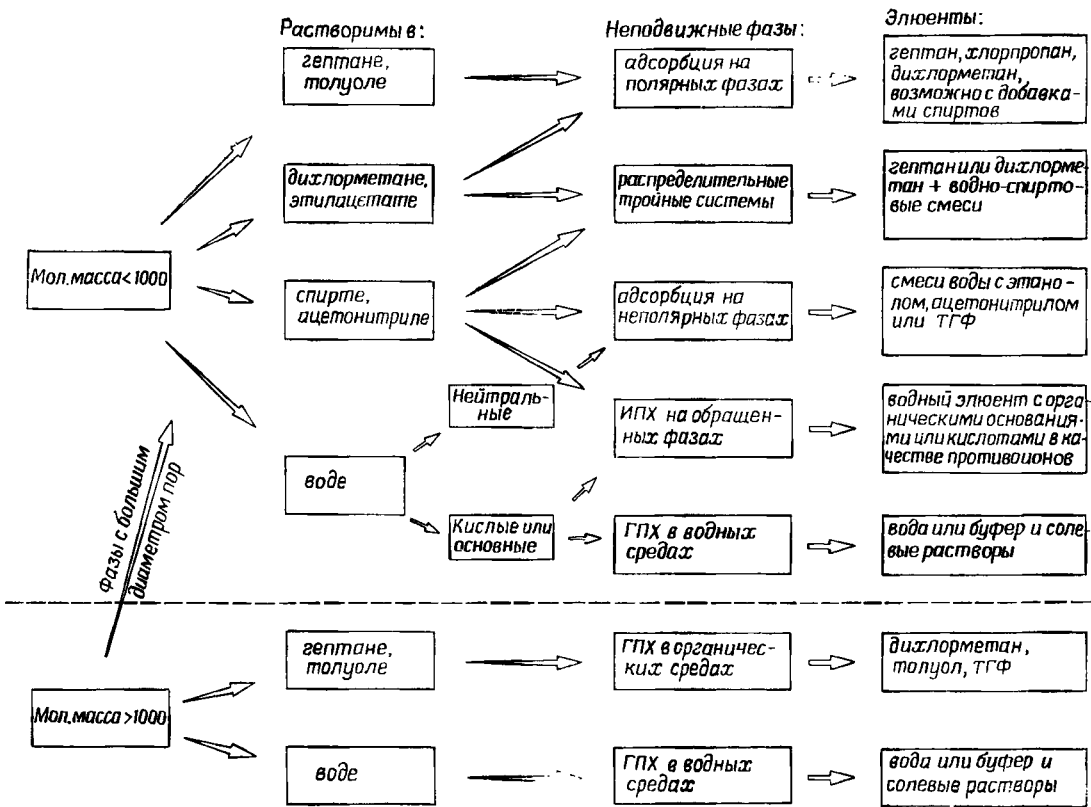


Рис. 2.37. Выбор разделительной системы в соответствии с растворимостью пробы

Таблица 2.5. Выбор хроматографической разделительной системы в соответствии со структурными параметрами разделяемых соединений

Структурный параметр	Адсорбционная		Распределительная система	Ионообменная	Гель-проникающая
	SiO ₂	обращенная фаза			
Размер	(+)	+	++		++
Гомологические ряды		++	++		(+)
Изомеры:	++	++			
конформационные	++	+			
положения	(+)	++			(+)
пространственные			С добавками или специальные привитые фазы		
оптические					
Тип и число заместителей:					
алкильные группы	(+)	++	++		
неполярные группы (ароматические, двойные связи, галогены)	++	++	+		
группы средней полярности (нитро-, сложноэфирные)	++	+	+		
полярные (фенольные, спиртовые, амидные)	+	++		(+)	
диссоциирующие группы, кислоты, основания			Предпочтительно ИПХ	(+)	

соединений. Оптимальным вариантом является такая система, которая позволяет осуществить необходимое разделение компонентов смеси за кратчайшее время в простых и легко контролируемых условиях.

Разделение водорастворимых проб лучше проводить методом обращенно-фазовой хроматографии. Удерживание увеличивается с увеличением гидрофобности соединений, т. е., иными словами, с уменьшением их растворимости в воде. Элюирование осуществляют, добавляя органические смешивающиеся с водой растворители в водные элюенты. Полярные соединения могут давать асимметричные и искаженные пики. Введение в элюент правильно выбранного противоиона увеличивает эффективность и влияет на селективность системы (см. раздел, посвященный ион-парной хроматографии).

Ионогенные соединения успешно разделяют при помощи ионообменной хроматографии. Разделение в этом случае происходит благодаря ионному воздействию растворенных соединений и неподвижной фазы. На удерживание влияют рН и ионная сила водного элюента. При этом не исключена возможность гидрофобных взаимодействий, которые можно контролировать по правилам обращенно-фазовой хроматографии. В системах указанного типа наблюдается заметное взаимодействие раство-

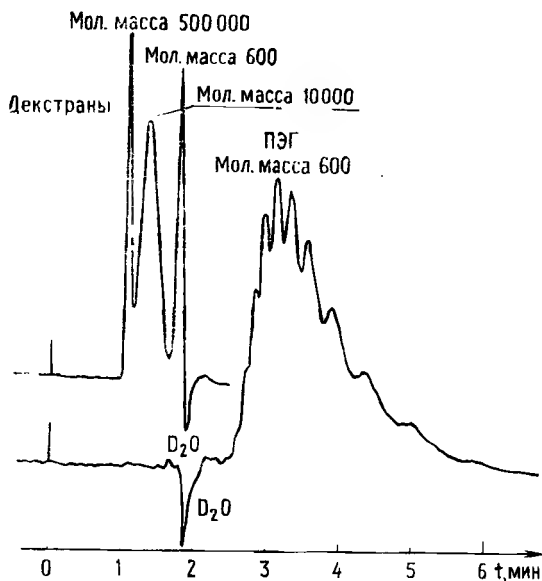


Рис. 2.38. Эксклюзия и сорбция декстранов и полиэтиленгликоля на гликофазе [98].

Неподвижная фаза: гликоль на лихросорбе Si100; элюент: вода; проба: декстраны с мол. массой 10 000 и 500 000, рафиноза (мол. масса 595), полиэтиленгликоль (мол. масса 600); инертное соединение: D_2O .

ренных соединений и неподвижной фазы. Сорбция разделяемых соединений на неподвижной фазе, особенно в условиях обращенно-фазовой хроматографии, приводит к структурным изменениям молекул, например разворачиванию белковых цепей. Для элюирования гидрофобных веществ могут потребоваться элюенты с довольно высоким содержанием органического компонента, что также может повлиять на структуру белков и, следовательно, на их биологическую активность. Качественный и количественный анализы пептидов и белков целесообразно проводить по методу обращенно-фазовой хроматографии в условиях градиентного элюирования. Чтобы избежать искажения пиков, в элюент можно ввести противоионы. Однако при препаративных разделениях это существенно затрудняет получение чистых компонентов.

Разделение по механизму ГПХ, согласно определению, предполагает отсутствие взаимодействия между разделяемыми соединениями и неподвижной фазой. Разрушение растворенных веществ должно быть минимальным. Разделение же их обусловлено лишь различиями в размерах молекул. Число пиков на гель-хроматограммах в принципе ограничено.

Итак, для анализа биологических объектов наибольший интерес представляет обращенно-фазовая хроматография, однако опасность структурных изменений белков и ферментов при этом также велика. Вероятность структурных изменений минимальна при разделении методом ГПХ, но его разделительная способность оставляет желать лучшего.

2.2.11. Соединение разделительных систем (система с распределением потока по колонкам)

Для улучшения разрешения бывает целесообразно разделить смесь на нескольких различных неподвижных фазах. С этой целью различные хроматографические колонки соединяют последовательно или параллельно. В отличие от газовой хроматографии элюент в таких хроматографических системах играет важную роль. В хроматографах с несколькими колонками менять состав подвижной фазы сложно. Поэтому при таком подходе приходится ограничиваться изменением длины колонки (числа теоретических тарелок) как фазового отношения неподвижной фазы (путем изменения количества жидкой неподвижной фазы, удельной поверхности, гидрофобности привитых фаз и т. д.). Выбор неподвижных фаз определяется главным образом их совместимостью с применяемыми элюентами. Обычно предварительное разделение осуществляется на относительно короткой колонке, фракции полученного при этом элюата последовательно разделяются на других колонках, заполненных той же самой или другими неподвижными фазами. Этот прием ускоряет анализ, увеличивает селективность и разрешение, позволяет осуществить предварительное концентрирование пробы или ее предварительную обработку в потоке.

Трудно дать какие-либо общие рекомендации по методике разделения с распределением потока, поскольку особенности такого разделения в большой степени зависят от его целей и состава пробы. Поэтому поясним ниже принцип метода на типичных примерах. Оборудование для разделения с распределением потока выпускает несколько фирм. Выбор оборудования для решения конкретной аналитической задачи требует в каждом случае индивидуального подхода и оптимизации условий процесса.

В тех случаях, когда требуется определить содержание лишь нескольких, а не всех компонентов сложной смеси, ускорить анализ можно при помощи так называемого метода «проходящего состава» (box-car) [121]. Суть метода заключается в следующем: сначала пробу разделяют на короткой колонке, после чего фракции, содержащие интересующие исследователя компоненты, подаются на вторую эффективную колонку, а остальные фракции направляются на сброс. На второй колонке последовательно, один за другим, осуществляется несколько анализов (мелькают вагоны проходящего поезда — отсюда и название метода).

Метод распределения потока позволяет оптимизировать селективность колонки и тем самым улучшить разрешение. В этом случае предварительно фракционированная проба разделяется на различных колонках, соединенных параллельно или последо-

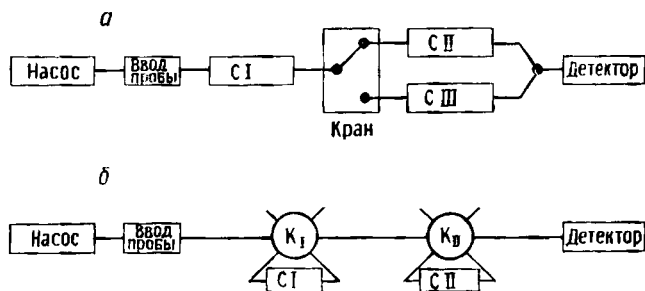


Рис. 2.39. Схема переключения колонок.

а — колонки соединены параллельно; б — переключение колонок для обогащения пробы и ее предварительного разделения (очистки). Переключение потока элюента, подаваемого насосами С I и С II, можно осуществить посредством переключающих кранов К I или К II соответственно.

вательно. Поскольку удалить элюент из распределительного сегмента сложно, применимость указанных систем ограничена лишь такими колонками, в которых элюирование ведется тем же элюентом, что и на стадии предварительного разделения. Соответствующие примеры описаны в работах [122, 123]. Разделение проводилось на колонках, содержащих различные количества неподвижной жидкой фазы (фазовое отношение) и неподвижные фазы с различной удельной поверхностью, при постоянном составе элюента. Схема этого метода показана на рис. 2.39. Предварительное разделение осуществлялось на колонке I. Представляющие интерес фракции, полученные на этой стадии, направлялись на колонку II или III. Если на колонке I достигалось приемлемое разделение всех компонентов пробы, то поступающий из этой колонки элюат направлялся непосредственно в детектор. Оптимизация системы проводилась очень тщательно. Переключение осуществлялось только в то время, когда из колонки I элюат не поступал. Практические возможности этого метода возрастают, если состав элюента можно оптимизировать перед каждой колонкой с помощью дополнительной системы подачи растворителя.

Часто хроматографисту достаточно определить один или лишь несколько компонентов сложной смеси. В этом случае систему с распределением потока используют для очистки пробы или обогащения ее микрокомпонентами непосредственно в потоке [124—127]. Так, при работе с биологическими объектами проводится, например, предварительное удаление из пробы полимерных компонентов, так как это позволяет увеличить время жизни аналитической колонки. В таких случаях к качеству колонки, на которой проводят предварительное разделение, не предъявляют жестких требований. Эту колонку можно заполнять неподвижными фазами с частицами большого размера

(недорогими материалами). Схема такого варианта разделения с переключением потока приведена на рис. 2.39, б. Колонка I также служит для предварительного разделения. Кран V_{11} расположен так, что колонка I непосредственно соединена с детектором в обход колонки II. Эффективность колонки I недостаточна для полного разделения пробы, поэтому часть элюента, поступающего из колонки I и содержащего интересующие исследователя компоненты, направляют на колонку II. Такое переключение может осуществляться в самом начале элюирования, или где-то на половине его, или же на конечном этапе предварительного обогащения. В то время когда разделение ведется на колонке II (насос соединен непосредственно с колонкой II и детектором), колонку I промывают и регенерируют, например пропуская обратный поток элюента при помощи второго насоса. Размыванием полос в кранах переключения и в коммуникациях можно пренебречь, если коэффициент емкости для разделяемых соединений на колонке II выше, чем на колонке I. В этом случае разделяемые соединения концентрируются в верхней части колонки II. Следует отметить, что смена элюента на начальном этапе элюирования с колонки II, если таковая возможна, ускоряет разделение.

Предварительное концентрирование можно осуществить по схеме, аналогичной приведенной на рис. 2.39, б. В данном случае раствор разбавленной пробы пропускают через колонку I. Если это водный раствор, в котором необходимо повысить концентрацию органических компонентов, колонку заполняют обращенной фазой. В конце этой стадии меняют элюент и элюируют удерживаемые на колонке вещества, причем интересующие исследователя фракции направляют для разделения на аналитическую колонку. В то время, когда на второй колонке проводится разделение, первую колонку промывают и регенерируют. Оптимизация состава элюента и условий разделения должна быть проведена с особой тщательностью, так как на выходе из первой колонки «вырезают» достаточно узкий сегмент элюата.

На рис. 2.40 на примере определения содержания циклоспорина А (CyA) в крови показано разделение с переключением потока и со сменой элюента для ускорения анализа [128]. Схема соединения колонок и переключения потока та же, что и на рис. 2.39, б. Пробу вводят в короткую предколонку, наполненную пористым носителем (диаметр частиц 30—40 мкм) с нанесенной обращенной фазой C_8 . Полярные компоненты разделяемой смеси элюируются на этой стадии и направляются непосредственно в детектор. Сегмент элюата на выходе из колонки, содержащий CyA и внутренний стандарт циклоспорин D (CyD), переносится более сильным элюентом в колонку II, заполненную неподвижной фазой C_{18} (диаметр частиц 5 мкм).

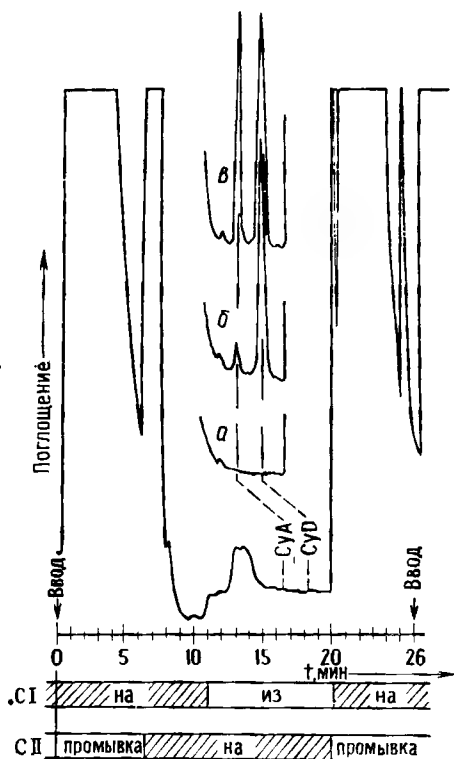


Рис. 2.40. Переключение колонок со сменой элюента для быстрой подготовки пробы к разделению по методу «вырезания сердцевинного потока» на примере определения циклоспорина А (СуА) в крови (см. также текст) [128].

а — кровь, не содержащая СуА; б — 100 нг/мл СуА; в — 1000 нг/мл СуД; обнаружение: по поглощению при 210 нм, 0,02 ед. поглощения.

Как показано на рис. 2.40, колонки I и II соединяют друг с другом только на короткое время с тем, чтобы проба из первой колонки перешла во вторую. Коэффициент емкости на второй колонке выше, поэтому зоны разделяемых соединений сужаются. Окончательное элюирование проводится другим, более сильным элюентом. В холостом опыте (сигнал А на рис. 2.40) какие-либо компоненты, мешающие обнаружению СуА, не элюируются, так что предел обнаружения можно существенно снизить. После завершения разделения колонку I вновь соединяют с детектором, регенерируют подходящим для этого растворителем и подготавливают для нового ввода пробы. Одновременно при помощи второго насоса регенерируют колонку II. Благодаря тому что на колонке II происходит сужение зон разделяемых компонентов, для анализа достаточно всего около 0,5 мл крови, причем предел обнаружения циклоспорина составляет 20 нг/мл.

Приведенные примеры показывают, что метод переключения потока позволяет повысить селективность разделения, провести обогащение разбавленных проб и осуществить избира-

тельное обнаружение нескольких компонентов, входящих в состав сложной смеси. Прием «вырезания» внутреннего сегмента элюата, поступающего из первой колонки, и переключение колонок можно использовать для автоматизированной предварительной обработки пробы и ее очистки в потоке.

Литература

1. Snyder L. R., Kirkland J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. Wiley-Interscience, New York, 1979.
2. Ангельгард Х. Высокоэффективная жидкостная хроматография. — М.: Мир, 1979.
3. Horvath C. High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, vol. 1, and 2, Academic Press, New York, 1980.
4. Krstulovic A. M., Brown P. R. Reserved-Phase High Performance Liquid Chromatography. Wiley-Interscience, New York, 1982.
5. Giddings J. C. Dynamics of Chromatography. Dekker, New York, 1965.
6. Guiochon G. in: C. Harvath (ed.): High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives, vol. 2, p. 1—56. Academic Press, New York, 1980.
7. Halász I. Z. Anal. Chem., **277**, 257 (1975).
8. Littlewood A. B. Gas Chromatography, 2nd Ed. Academic Press, New York, 1970.
9. Halász I. in: J. J. Kirkland (ed.): Modern Practice of Liquid Chromatography, Ch. 9. Wiley-Interscience, New York, 1971.
10. Eisenbeiss F., Merch E. AG, Darmstadt, частное сообщение.
11. DiGisare J. L., Dong M. W., Ettre L. S. Chromatographia, **14**, 257 (1981).
12. Domalgaska D. E., Loscombe C. R., Chromatographia, **15**, 657 (1982).
13. Halász I., Görlitz G. Angew. Chem., **94**, 50 (1982).
14. Halász I. Ber. Bunsenges, **77**, 140 (1973).
15. Bristow P. A. J. Chromatogr., **149**, 13 (1978).
16. Ende R., Halász I., Unger K. K. J. Chromatogr., **99**, 377 (1974).
17. Ahr G., Ph. D. Thesis, Universität des Saarlandes. Saarbrücken, 1982.
18. Halász I., Ende R., Asshauer J. J. Chromatogr., **112**, 37 (1975).
19. Unger K. K., Messner W., Krebs K. F. J. Chromatogr., **149**, 1 (1978).
20. Ohmacht R., Halász I. Chromatographia, **14**, 155 (1981).
21. Ohmacht R., Halász I. Chromatographia, **14**, 216 (1981).
22. Kennedy G. J., Knox J. H. J. Chromatogr. Sci., **10**, 549 (1972).
23. Knox J. H., Vasvari J. Chromatogr., **83**, 181 (1973).
24. Knox J. H., Pryde A. J. Chromatogr., **112**, 171 (1975).
25. Elgass H., Engelgardt H., Halász I. Z. Anal. Chem., **294**, 97 (1979).
26. Wheeler A., in: P. H. Emmett (ed.): Catalysis, vol. 2, p. 116, Reinhaol., New York, 1955.
27. Halász I., Martin K. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **17**, 901 (1978).
28. Айлер П. К. Химия кремнезема. — М.: Мир, 1982.
29. Inger K. K. Porous Silica. Elsevier, Amsterdam, 1979.
30. Engelhardt H., Müller H. J. Chromatogr., **218**, 395 (1981).
31. Müller H., Engelhardt H., in: I. Molnar (ed.): Practical Aspects of Modern HPLC, p. 25, de Gruyter, Berlin, 1982.
32. Engelhardt H., Dreyer B., Schmidt H. Chromatographia, **16**, 11 (1982).
33. Snyder L. R. Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York, 1968.
34. Böhme W., Engelgardt H. J. Chromatogr., **133**, 67 (1977).
35. Engelhardt H. J. Chromatogr. Sci., **15**, 380 (1977).

36. Karger B. L., Engelhardt H., Conroe K., Halász I. in: N. Stock (ed.): *Gas Chromatography*, p. 112. Institut of Petroleum, London, 1971.
37. Engelhardt H., Asshauer J., Neue U., Weigand N. *Anal. Chem.*, **46**, 336 (1974).
38. Huber J. F. K., Meijers C. A. M., Hulsman J. A. R. J. *Anal. Chem.*, **44**, 111 (1972).
39. Meijers C. A. M., Hulsman J. A. R. J., Huber J. F. K. *Z. Anal. Chem.*, **261**, 347 (1972).
40. Brugman W. J. Th., Heemstra S., Kraak J. C. J. *Chromatogr.*, **218**, 285 (1981).
41. Nasner A., Kraus L. *Chromatogr.*, **216**, 389 (1981).
42. Brugman W. J. T., Heemstra S., Kraak J. C. *Chromatographia*, **15**, 282 (1982).
43. Howard G. A., Partin A. J. P. *Biochem. J.*, **46**, 532 (1950).
44. Halász I., Sebastian I. *Angew. Chem.*, **81**, 464 (1969).
45. Halász I., Sebastian I. J. *Chromatogr. Sci.*, **12**, 161 (1974).
46. Kirkland J. J. J. *Chromatogr. Sci.*, **9**, 206 (1971).
47. Unger K. K., Becker N., Roumeliotis P. J. *Chromatogr.*, **125**, 115 (1976).
48. Kirkland J. J. J. *Chromatogr. Sci.*, **9**, 206 (1971).
49. Lillig B. Master Thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1980.
50. Engelhardt H., Ahr G. *Chromatographia*, **14**, 227 (1981).
51. Horvath C., Melander W., Molnar I. *Anal. Chem.*, **49**, 142 (1977).
52. Kurch K., Sebastian I., Halasz I., Engelgardt H. J. *Chromatogr.*, **122**, 171 (1976).
53. Engelhardt H., Aufsatz M. *Ann. Univ. Saraviensis*, **15**, 55 (1980).
54. Bakalyar S. R., McIlwrick R., Roggendorf E. J. *Chromatogr.*, **142**, 353 (1977).
55. Tanaka N., Goodell H., Karger B. L. J. *Chromatogr.*, **158**, 233 (1978).
56. Hearn M. T. W. in: J. C. Giddings, E. Grushka, J. Cazes, P. R. Brown (eds.): *Advances in Chromatography*, vol. 20, p. 1—82. Dekker, New York, 1982.
57. Grego B., Hearn M. T. W. *Chromatographia*, **14**, 589 (1981).
58. Roggendorf E., Spatz R. J. *Chromatogr.*, **204**, 263 (1981).
59. Spectra Physics GmbH, Darmstadt, частное сообщение.
60. Glajch J. L., Kirkland J. J., Squire K. M., Minor H. M. J. *Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
61. Snyder L. R., Glajch J. L., Kirkland J. J. J. *Chromatogr.*, **218**, 299 (1981).
62. Schoenmakers P. J., Drouen A. C. J. H., Billiet H. A. H., de Galan L. *Chromatographia*, **15**, 688 (1982).
63. Helljjerich F. Ionen austauscher Verlag Chemie, Weinheim, 1959.
64. McGormick R. M., Karger B. L. *Anal. Chem.*, **52**, 2249 (1980).
65. Fong G. W. K., Grushka E. *Anal. Chem.*, **50**, 1154 (1978).
66. Horvath C. (ed.) in: *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 2, p. 113—318, Academic Press, New York, 1980.
67. Schill G. in: J. A. Marinsky, Y. Marcus (eds.): *Ion Exchange and Solvent Extraction*, vol. 6, Dekker, New York, 1974.
68. Karger B. L. in: C. Horvath (ed.): *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 1, p. 113—206, Academic Press, New York, 1980.
69. Crommen J., Schill G. J. *Chromatogr.*, **142**, 283 (1977).
70. Pietrzyk D. J., Kroeff E. P., Rotsch T. E. *Anal. Chem.*, **50**, 497 (1978).
71. Horvath C., Melander W., Molnar I. *Anal. Chem.*, **49**, 142 (1977).
72. van de Venne J. L. M., Hendriks L. L. H. M., Deelder R. S. J. *Chromatogr.*, **167**, 1 (1978).
73. Schomburg G., Zegarski K. J. *Chromatogr.*, **114**, 174 (1974).
74. Vivilecchia R., Thiebaud M., Frei R. W. *Chromatogr. Sci.*, **10**, 411 (1972).
75. LePage J. N., Lindner W., Davies G., Seitz D. E., Karger B. L. *Anal. Chem.*, **51**, 433 (1979).

76. Hare P. E., Gil-Av E. *Science*, **204**, 1226 (1979).
77. Crispin T., Halász I. J. *Chromatogr.*, **239**, 351 (1982).
78. Horvath C., Preiss B., Lipsky S. R. *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
79. Orth P. Ph. D. Thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1979.
80. Martinsson E., Samuelson O. J. *Chromatogr.*, **50**, 429 (1970).
81. Spackman D. H., Moore S., Stein W. H. *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
82. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.*, **192**, 663 (1951).
83. Weigele M., De Bernado S. L., Tergi J. P., Leimgruber W. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5927 (1972).
84. Udenfried S., Stein S., Böhlen P., Dairman W., Leimgruber W., Weigele M. *Science*, **178**, 871 (1972).
85. Engelhardt H., Neue U. D. *Chromatographia*, **15**, 403 (1982).
86. Lillig B. Ph. D. Thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1984.
87. Snyder L. R. in: C. Horvath (ed.): *High Performance Liquid Chromatography, Advances and Perspectives*, vol. 1, p. 207—316. Academic Press, New York, 1980.
88. Elgass H. Ph. D. Thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken 1978.
89. Barth H. G. *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 409 (1980).
90. Pfannkoch E., Lu K. C., Regnier F. E., Barth H. G. *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 430 (1980).
91. Engelhardt H., Mathes D. J. *Chromatogr.*, **185**, 305 (1979).
92. Engelhardt H., Mathes D. *Chromatographia*, **14**, 325 (1981).
93. Engelhardt H., Ahr G., Hearn T. W. *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 1361 (1981).
94. Neddermeyer B. A., Rogers L. B. *Anal. Chem.*, **47**, 95 (1969).
95. Vollmert B. *Polymer Chemistry*. Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 1973.
96. Grubisic Z., Rempp R., Benoit H. J. *Polym. Sci.*, **5**, 753 (1967).
97. Horiike K., Tojo H., Yamano T., Nozaki M. *Biochem. Int.*, **4**, 447 (1982).
98. Engelhardt H., Mathes D. J. *Chromatogr.*, **142**, 311 (1977).
99. Qualls C. W., Jr., Segall H. J. *J. Chromatogr.*, **150**, 202 (1978).
100. Brust O. E., Halasz I. J. *Chromatogr.*, **83**, 15 (1973).
101. Holstein W. *Chromatographia*, **14**, 469 (1981).
102. Snyder L. R., Schunk T. C. *Anal. Chem.*, **54**, 1764 (1982).
103. Linden J. C., Lawhead C. L. *J. Chromatogr.*, **105**, 125 (1975).
104. Meagher R. B., Furst A. J. *Chromatogr.*, **117**, 211 (1975).
105. Orth P., Engelhardt H. *Chromatographia*, **15**, 91 (1982).
106. Blaschke G. *Angew. Chemie*, **92**, 14 (1980).
107. Hesse G., Hagel R. *Chromatographia*, **6**, 277 (1973).
108. Pirkle W. H., House D. W. *J. Org. Chem.*, **12**, 1957 (1979).
109. Pirkle W. H., Finn J. M. *J. Org. Chem.*, **46**, 2935 (1979).
110. Davankov V. A. in: J. C. Giddings, E. Grushka, J. Cazes, P. R. Brown (eds.): *Advances in Chromatography*, vol. 18, p. 139—196. Dekker, New York, 1980.
111. Foucault A., Caude M., Oliveros L. J. *Chromatogr.*, **185**, 345 (1979).
112. Gübitz G., Jellenz W., Löfler G., Santi W. J. *High Resol. Chromatogr.*, **3**, 145 (1979).
113. Engelhardt H., Kromidas S. *Naturwissenschaften*, **67**, 353 (1980).
114. Lindner W. *Naturwissenschaften*, **67**, 354 (1980).
115. Roumeliotis P., Unger K. K., Kurganov A. A., Davankov A. V. *Lecture, Philadelphia* (1982).
116. Kromidas S. Ph. D. Thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 1983.
117. Engelhardt H., Elgass H. J. *Chromatogr.*, **158**, 249 (1978).
118. Жидкостная колонная хроматография/Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.
- 119*. Heftmann E. *Chromatography*, 3rd Ed. Reinhold, New York, 1975.

* См. также: Хроматография. Практическое применение метода/Под ред. Э. Хефтмана. — М.: Мир, 1987.

120. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам./Под ред. О. Микеша. — М.: Мир, 1982.
121. Snyder L. R., Dolan J. W., van der Wal S. J. Chromatogr., **203**, 3 (1981).
122. Huber J. F. K., van der Linden R., Ecker E., Oreans M. J. Chromatogr., **83**, 267 (1973).
123. Dolphin R. J., Willmot F. W., Mills A. D., Hoogveen L. P. J. J. Chromatogr., **122**, 259 (1976).
124. Erni F., Keller H. P., Morin C., Schmitt M. J. Chromatogr., **204**, 65 (1981).
125. Hulpke H., Werthmann U. Chromatographia, **12**, 390 (1979).
126. Hulpke H., Werthmann U. Chromatographia, **13**, 395 (1980).
127. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss F. W. J. Chromatogr., **222**, 13 (1981).
128. Nussbaumer K., Niederberger W., Keller H. P. HRC and CC, **5**, 424 (1982).
129. Krstulovic A. M., Coltn H., Guiochon G. Anal. Chem., **54**, 2438 (1982).

Аппаратура

К.-П. Хупе, Г. Розинг, Х. Шренкер
(K.-P. Hupe, G. Rozign, H. Schrenker)

3.1. Введение

ВЭЖХ — сравнительно новая аналитическая методика. Промышленное изготовление приемлемой аппаратуры такого рода было налажено лишь примерно 10 лет назад. При разработке этой методики были применены знания, накопленные в результате изучения родственных аналитических методов — классической колоночной, газовой и тонкослойной хроматографии, к тому времени уже завоевавших признание. Однако вскоре стало очевидно, что уже отработанные практические приемы могут быть лишь отчасти использованы в процессе разработки аппаратуры для «современной жидкостной хроматографии» — таким было первоначальное название этого метода, поскольку необходимо учитывать целый ряд весьма специфических требований, обусловленных следующими особенностями методики.

а. Колонки для ВЭЖХ наполняют носителем с очень малым диаметром частиц. В результате при таких объемных скоростях растворителя, которые необходимы для быстрого разделения пробы, на колонке создается высокое давление.

б. Детекторы, применяемые в ВЭЖХ, чувствительны к флуктуации потока и давления элюента (шумы). Более того, при применении концентрационных детекторов необходима еще более высокая стабильность объемной скорости элюента.

в. Процесс хроматографического разделения сопровождается рядом антагонистических эффектов, так, например, диспергирование образца в подвижной фазе ведет к смешению разделяемых компонентов и снижает максимальную концентрацию вещества в элюируемом пике (в детекторе). Диспергирование наблюдается на всех участках системы от точки ввода пробы до детектора.

г. Растворители, выполняющие роль подвижной фазы, часто способны вызывать коррозию аппаратуры. Это в первую очередь относится к растворителям, используемым в обращенно-фазовой хроматографии, которая предпочтительна в биохимических приложениях ВЭЖХ.

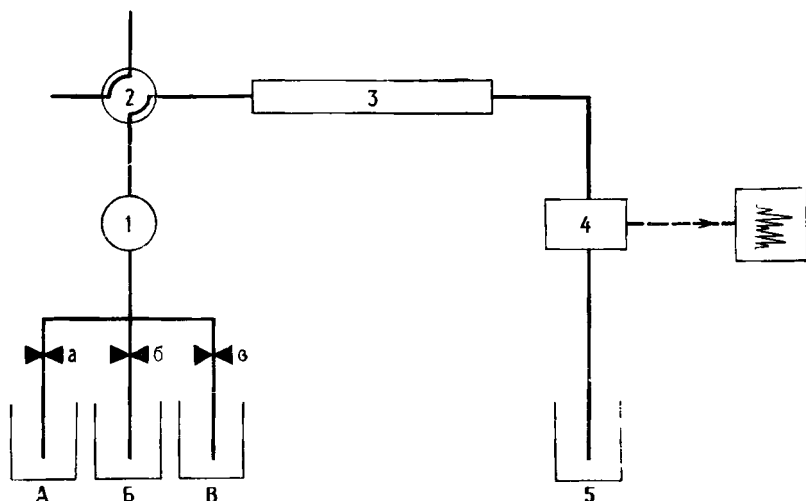


Рис. 3.1. Схема жидкостного хроматографа.

А, Б, В — резервуары для растворителя; *а, б, в* — дозирующие краны; *1* — насос; *2* — кран для ввода пробы; *3* — колонка; *4* — детектор; *5* — емкость для элюата.

Специфику ВЭЖХ как инструментальной методики необходимо учитывать в процессе разработки, создания и эксплуатации этих систем. Для создания коммерческих образцов хроматографических систем и их компонентов, достаточно надежных, простых и безопасных в работе с приемлемым соотношением между ценой и техническими характеристиками, потребовалось более десяти лет поисков и исследований. Наметившиеся в последнее время тенденции к уменьшению колонок (как длины, так и диаметра) заставляют предъявлять новые требования к инструментам. Особенно это касается пп. «б» и «в».

Цель данной главы:

дать определение ряда технических терминов, употребляемых при описании инструментов для ВЭЖХ;

объяснить основные принципы работы наиболее важных элементов жидкостного хроматографа;

дать более подробное описание важнейших технических характеристик, которые влияют на результаты качественного и количественного анализа;

дать рекомендации по наиболее эффективному использованию инструментов.

На рис. 3.1 схематически изображены основные элементы жидкостного хроматографа; насос *1* подает один или несколько растворителей из резервуаров *А, Б, В* в систему. Состав элюента контролируется дозирующими кранами *а, б, в*. Обра-

зец вводят в колонку 3 посредством крана 2. Выходящий из колонки поток элюата непрерывно контролируется при помощи детектора 4, выходной сигнал которого регистрируется самописцем или другим устройством с целью дальнейшей количественной и (или) качественной интерпретации. Поступающий из детектора элюат накапливается в коллекторе 5.

3.2. Система подачи растворителя

3.2.1. Хранение растворителя

Большинство растворителей, используемых в ВЭЖХ в качестве подвижной фазы, имеют два нежелательных свойства, которые следует учитывать при хранении их и работе с ними.

а. Многие растворители токсичны. Существует понятие «предельно допустимая концентрация» (ПДК), под которой подразумевают максимальную разрешенную концентрацию паров вещества в рабочих помещениях. Данные по ПДК различных соединений можно найти в справочниках [1, 2]. ПДК ацетонитрила — растворителя, наиболее широко применяемого в ВЭЖХ, составляет $40 \cdot 10^{-4} \%$.

Во избежание загрязнения рабочего помещения резервуары для растворителей в жидкостном хроматографе должны иметь герметичные крышки. Пространство над растворителем необходимо медленно продувать инертным газом (который после этого следует пропускать через поглотитель паров растворителя или направлять в вытяжной шкаф), что предотвратит создание вакуума в резервуаре и не позволит растворителю поглощать воздух.

б. Обычно в лабораторию поступают растворители, насыщенные воздухом. Это может привести к различным нарушениям в работе прибора. Образование воздушных пузырьков в результате спонтанной деаэрации растворителя (особенно в области впускного клапана насоса) способно нарушить или даже сделать вообще невозможной его нормальную работу. Данный эффект особенно усиливается, если температура насоса значительно выше температуры растворителя в резервуаре. Это объясняется тем, что растворимость воздуха в водных растворах понижается примерно на 1% с увеличением температуры на 1°C. Воздушные пузырьки образуются также при смешении растворителей на стороне низкого давления перед насосом, например при смешении воды и метанола (растворимость воздуха в смеси ниже, чем в отдельных растворителях).

Газовые пузырьки могут образовываться и в ячейке детектора, ухудшая стабильность его нулевой линии. Этого можно избежать, установив небольшой ограничитель потока на выходе из детектора. Гораздо менее изучено влияние растворенных

газов на сигнал многих детекторов для ЖХ. Экспериментальные данные, подтверждающие влияние растворенного воздуха (кислорода) на УФ- и флуоресцентные детекторы, опубликованы в работах [3, 4]. Коэффициент преломления подвижной фазы также зависит от количества растворенного в ней газа. Как следствие при изменении содержания газа в растворителе возможен дрейф нулевой линии (это может происходить при изменении температуры в резервуаре с растворителем). Полная деаэрация подвижной фазы особенно важна при использовании электрохимического детектора в восстановительном режиме.

Наиболее распространенная процедура деаэрации растворителей в ВЭЖХ — их продувка гелием или азотом. С этой целью растворитель (1 л) обычно продувают в течение 10 мин газом со скоростью 100 мл/мин, после чего скорость продувки можно снизить до 10 мл/мин. При этом следует помнить, что в данном случае воздух, растворенный в подвижной фазе, заменяется на азот или гелий. Если используются насосы, клапаны которых чувствительны к образованию пузырьков, более предпочтительным может оказаться деаэрирование путем нагрева или вакуумирования.

3.2.2. Насосы для подачи растворителя

Насосы для подачи растворителя создают «постоянный» поток подвижной фазы под давлением, необходимым для преодоления гидродинамического сопротивления колонок. Прежде чем обсуждать методы, наиболее часто используемые для решения этой задачи, необходимо рассмотреть, насколько важно требование постоянства объемной скорости при проведении количественного и качественного анализов методом ЖХ.

3.2.2.1. Стабильность потока и точность анализа. В процессе элюирования анализируемое соединение распределяется в определенном объеме подвижной фазы, который называется объемом пика V . Вместе с потоком подвижной фазы это соединение проходит через ячейку детектора, формирующего выходной сигнал, пропорциональный концентрации анализируемого соединения в объеме пика, и регистрируется в виде пика шириной w_b (в единицах времени) на ленте самописца, подключенного к детектору.

$$w_b = V/F \text{ (если } F = \text{const)}$$

где F — объемная скорость подвижной фазы.

Поскольку площадь пика определяется его высотой и шириной, совершенно очевидно, что эта наиболее часто употреб-

ляемая характеристика пиков непосредственно зависит от изменений объемной скорости при прохождении соответствующей зоны (пика) через ячейку детектора.

Кроме того, изменение объемной скорости подвижной фазы влияет также на эффективность колонки (высоту, эквивалентную теоретической тарелке), что проявляется в определенной зависимости высоты пика (и его ширины) от объемной скорости подвижной фазы.

Время удерживания t_R , используемое для качественного отнесения пика соединения, также зависит от объемной скорости подвижной фазы:

$$t_M = \frac{1}{F} V_M \quad \text{и} \quad t_R = \frac{1}{F} V_M (1 + k)$$

где V_M — мертвый объем подвижной фазы в колонке, t_M — мертвое время колонки, или время выхода инертного несорбируемого соединения ($k=0$).

По различному воздействию на результаты анализа флуктуации потока растворителя можно подразделить на шумы, блуждания и дрейф, которые можно охарактеризовать отношением их собственного времени воздействия к средней продолжительности выхода пика и его времени удерживания [6].

Шумы потока, основной период флуктуаций которых меньше средней ширины основания пика, в основном ответственны за шумы нулевой линии детекторов (особенно рефрактометрических и электрохимических) и, таким образом, влияют на идентификацию пиков электронными интеграторами (в области малых отношений сигнал/шум) и на пределы обнаружения.

Блуждания потока характеризуются периодом флуктуаций, равным 1—10 величинам средней ширины основания пика. Они непосредственно влияют на точность определения площади пика. Величина их воздействия определяется отношением основного периода флуктуаций к ширине основания пика. Как показывает рис. 3.2, блуждание потока достигает максимума воздействия на точность определения площади пика в области периода флуктуаций, равного 5—10 величинам основания пика [6, 7].

Дрейф потока характеризуется периодом флуктуаций, превышающим время удерживания пика. Он одинаково влияет на время удерживания пика и его площадь: увеличение объемной скорости ведет к уменьшению времени удерживания и площади пика, и наоборот. В результате с увеличением периода флуктуаций, т. е. при длительном увеличении или уменьшении объемной скорости, количественные ошибки становятся систематическими.

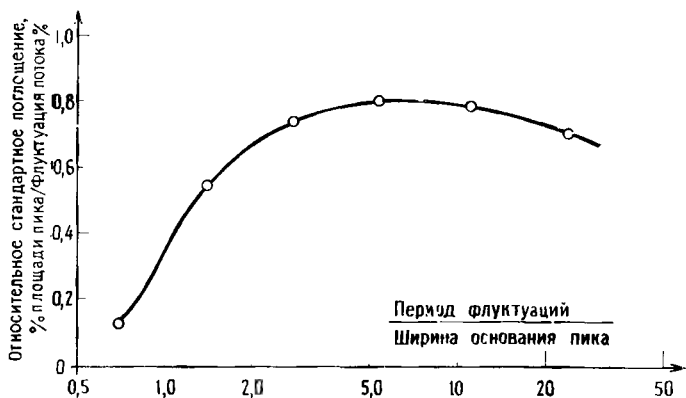


Рис. 3.2. Влияние блуждания потока на величину стандартного отклонения площади пика.

Это влияние достигает максимума, когда период флуктуаций (величина, обратная частоте флуктуаций) равен 5—10-кратной ширине основания пика.

Уменьшить такие систематические ошибки можно путем проведения частых градуировок и применения внутреннего стандарта.

3.2.2.2. Принципы работы насосов. По изложенным причинам поток растворителя, подаваемый насосом в жидкостной хроматограф, не должен пульсировать (должны отсутствовать шумы), должен быть постоянным (должны отсутствовать блуждания и дрейф) и воспроизводимым (изо дня в день).

Для достижения этих целей используются насосы различных типов. На рис. 3.3—3.8 представлены схемы тех из них, которые наиболее распространены в настоящее время.

Насосы с пневматическим усилителем и насосы со шприцем высокого давления (рис. 3.3 и 3.4) уже не поступают на рынок оборудования для ВЭЖХ, однако ими оснащены более старые хроматографы, которыми еще пользуются во многих лабораториях.

Абсолютное большинство насосов для ВЭЖХ, предлагаемых в настоящее время, представляют собой одно-, двух- или трехпоршневые возвратно-поступательные насосы с диафрагмой или без нее. В них в той или иной мере реализуется один из принципов действия, показанных схематически на рис. 3.5—3.8.

Все эти насосы требуют некоторого дополнительного контроля за постоянством потока. Общая их особенность — уменьшение объемной скорости растворителя («скатывание») с увеличением давления вследствие сжимаемости жидкости. Избе-

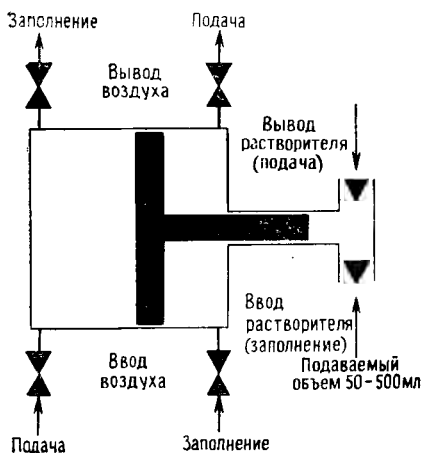


Рис. 3.3. Насос с пневматическим усилителем.

Создает поток без пульсаций при постоянном давлении; объемная скорость в колонке зависит от ее сопротивления, т. е. задается величиной давления воздуха.

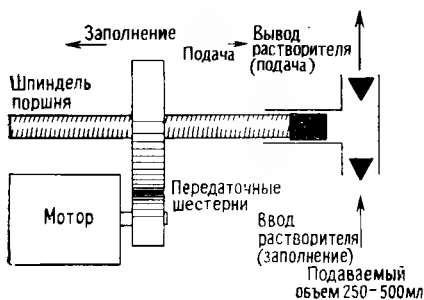


Рис. 3.4. Шприцевой (положительного вытеснения) насос.

Создает поток без пульсаций (если не меняется давление); объемная скорость определяется скоростью поступательного движения поршня.

жать снижения объемной скорости можно при помощи одного из четырех следующих подходов.

а. Цепь обратной связи для компенсации скатывания (используемая в насосах типа показанных на рис. 3.5 и 3.6) корректирует работу привода насоса в соответствии с результатами измерения давления на выходе.

б. Обратная связь по скорости потока (используется в насосе типа показанного на рис. 3.7). Работающий независимо от насоса датчик потока измеряет его скорость и через линию обратной связи корректирует работу привода насоса, если скорость отличается от заданной.

в. Работа насоса в режиме постоянного давления (используется для насоса типа показанного на рис. 3.6). Регулятор давления между насосом и колонкой создает постоянное давление на выходе из насоса вне зависимости от сопротивления колонки, скорости потока и типа растворителя.

г. Двухстадийные насосы (рис. 3.8). Два независимых насоса работают последовательно; насос низкого давления слу-

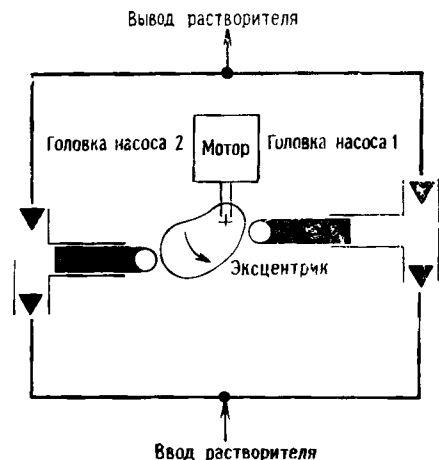


Рис. 3.5. Возвратно-поступательный насос с двумя головками и приводом посредством эксцентрика.

Создает постоянный поток (если правильно компенсировано скагивание) с относительно низкими пульсациями; объемная скорость определяется скоростью вращения эксцентрика (частотой хода поршня обычно 0,01, ..., 1 Гц); дальнейшее улучшение стабильности потока возможно при использовании насоса с тремя параллельными головками, работающими со сдвигом фаз в 120° друг относительно друга.

жит устройством измерения потока; насос высокого давления подает на колонку любой объем жидкости, поступающий от первого насоса, под заданным давлением. Работа насоса высокого давления («вспомогательного») контролируется таким образом, что всасываемый им поток жидкости был сбалансирован с потоком, подаваемым измерительным насосом низкого давления.

Поток жидкости, создаваемый возвратно-поступательным насосом, всегда пульсирует в соответствии с частотой перемещения поршня. Несмотря на то что в насосах с одной головкой пульсация снижается в результате максимально возможного сокращения времени заполнения (рис. 3.6), а в насосах с двойной или тройной головкой — в результате наложения рабочего хода плунжеров (рис. 3.5), очень часто требуется дополнительное гашение пульсаций. Обычный демпфер пульсаций представляет собой гидравлический аналог электрического конденсатора. В принципе это небольшой эластичный сосуд, кото-

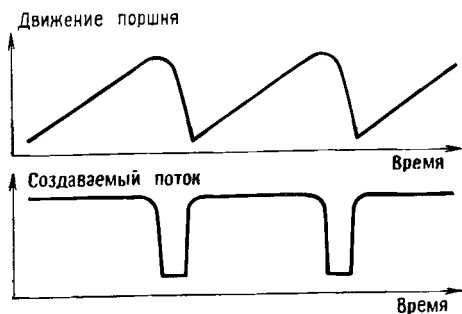
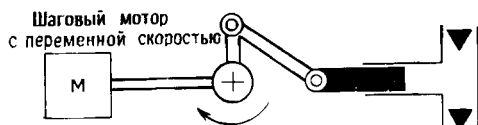


Рис. 3.6. Возвратно-поступательный насос с одной головкой и приводом посредством кривошипно-шатунного механизма.

Создает постоянный поток (если правильно компенсировано скапывание) с пульсациями средней величины (требуется демпфер для сглаживания пульсаций); объемная скорость определяется частотой хода поршня, обычно 0,02, ..., 2 Гц; быстрое заполнение путем увеличения скорости вращения мотора на фазе впуска.

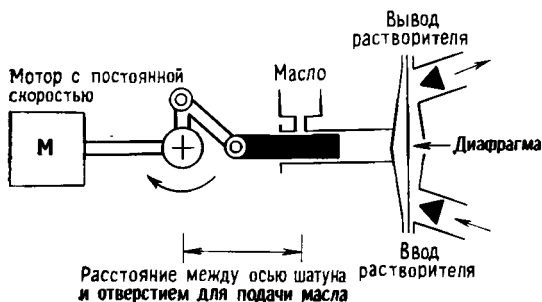


Рис. 3.7. Диафрагменный насос с одной головкой и приводом посредством кривошипно-шатунного механизма.

Движение поршня передается в вытеснительную емкость насоса посредством масла и гибкой стальной диафрагмы; создает постоянный поток (при наличии линии обратной связи); частота хода поршня постоянна (5... 10 Гц); объемная скорость определяется регулировкой величины рабочего хода поршня; эффективное гашение пульсаций увеличивается постоянной и высокой частотой хода поршня.

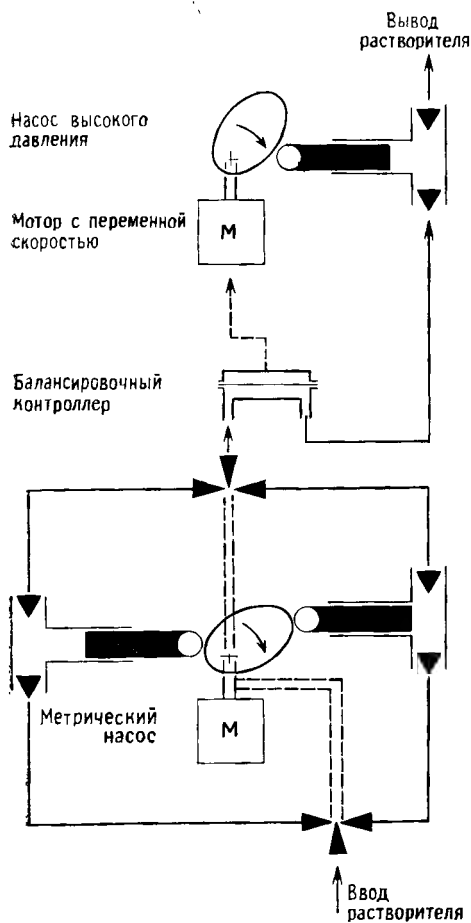


Рис. 3.8. Двухстадийный возвратно-поступательный насос.

Метрический насос низкого давления определяет объемную скорость; насос высокого давления (вторая стадия), который управляется балансирующим насосы контроллером, создает необходимое рабочее давление; работа впускного и выпускного клапанов метрического насоса синхронизирована с работой привода.

рый «проглатывает» часть объема жидкости, подаваемой насосом во время одного рабочего хода, и впрыскивает его в колонку в то время, когда насос заполняется.

3.2.3. Смешение растворителей и системы формирования градиента

В ЖХ очень часто подвижная фаза представляет собой смесь двух и более растворителей, соотношение которых легко изменить в процессе анализа согласно заданной программе (градиентное элюирование). Таким образом, в системе подачи растворителя должен быть предусмотрен контроль за соотношением растворителей.

3.2.3.1. Состав подвижной фазы, стабильность и точность анализов. Влияние точности соблюдения необходимого соотношения компонентов подвижной фазы на результаты качественного и количественного анализов, осуществляемых методом ЖХ, не столь очевидно, как влияние стабильности потока, особенно при градиентном элюировании. Для заданных неподвижной фазы и исследуемой пробы состав (и природа) подвижной фазы определяет равновесное распределение образца между фазами и, таким образом, влияет на коэффициент емкости k , который в свою очередь определяет время удерживания t_R . В литературе (см., например, [8, 9]) приводятся многочисленные данные, описывающие зависимость коэффициента емкости от состава подвижной фазы в обращенно-фазовой хроматографии. Как правило, изменение состава подвижной фазы на 1% в условиях изократического элюирования (возможны также большие или меньшие изменения) приводит к 3—10%-ному изменению времени удерживания.

Если проводится градиентное элюирование, отклонение действительного состава растворителя от запрограммированного обычно оказывает большее влияние, особенно на заключительной стадии процесса. Более того, требования к точности воспроизведения состава элюента возрастают с уменьшением длины колонки, уменьшением крутизны градиента и увеличением скорости подачи подвижной фазы [7].

3.2.3.2. Типы систем смещения растворителей и формирования градиента. Для автоматического смещения растворителей и создания градиента используют два следующих метода:

а. Каждый из растворителей подают при помощи отдельного насоса с контролируемой производительностью. Подаваемые этими насосами растворители смешиваются в смесительной камере малого объема. Объемное соотношение растворителей в получаемой смеси определяется соотношением объемных скоростей растворителей $F_1, F_2, \dots$, подаваемых насосами $P_1, P_2, \dots$, и суммарной объемной скоростью подачи всех растворителей (рис. 3.9):

$$\text{Растворитель } k = (F_k / \sum F_i) 100, \text{ об. } \%$$

Для того чтобы соотношение растворителей в смесях, получаемых таким способом, соответствовало требуемому (получаемому в емкости путем смешения соответствующих объемов растворителей), контроллер объемной скорости должен быть отградуирован по объемным скоростям поступления растворителей в насосы.

б. Вход насоса через систему распределительных клапанов, работающих в режиме разделенного времени, соединен с емкостями для растворителей 1, 2..., т. е. насос последовательно

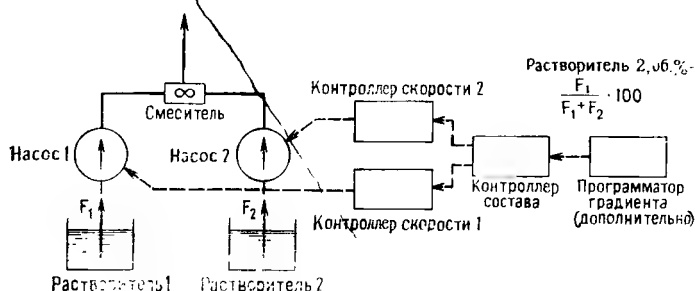


Рис. 3.9. Пример устройства для смешения двух растворов.

Два насоса с контролируемой объемной скоростью определяют соотношение растворов в элюенте (об. %).

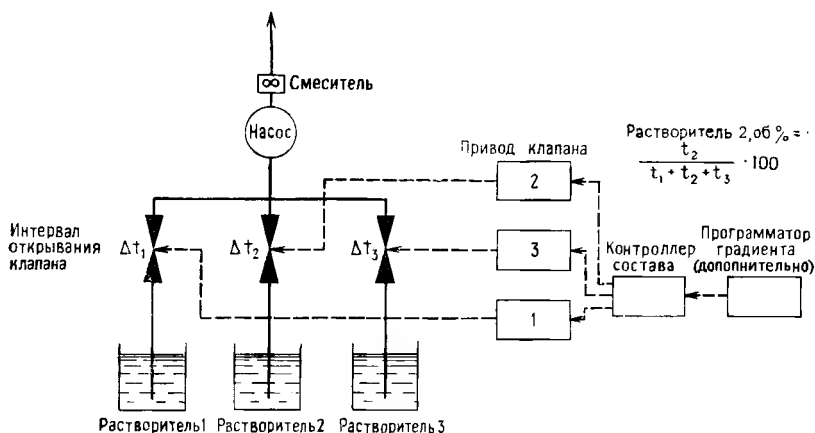


Рис. 3.10. Пример устройства для смешения трех растворов.

Три распределительных клапана, открывающихся последовательно на заданные промежутки времени, определяют соотношение растворов в элюенте.

подает растворители 1, 2... в течение интервалов времени $\Delta t_1, \Delta t_2...$ (рис. 3.10). Если скорость поступления растворов F в насос постоянна, их объемное отношение в смеси определяется отношением указанных интервалов времени $\Delta t_1, \Delta t_2...$, в течение которых клапаны $V_1, V_2...$ остаются открытыми, и суммарным временем подачи растворов:

$$\text{Растворитель } k = (\Delta t_k / \Sigma \Delta t_i) 100, \text{ об. \%}$$

Обычно интервалы Δt_i синхронизованы с временем всасывания насоса Δt_p , которое определяется периодом открывания и закрывания впускного клапана насоса, т. е. $\Sigma t_i = t_p$. Следовательно, объединение возвратно-поступательного насоса и блока

распределительных клапанов другого производства не обеспечит требуемой точности смешения растворителей, если только возможность такого объединения не предусмотрена самим производителем насоса.

Смешение растворителей в любом из устройств осуществляется по «методу сложения объемов», изменения объема, происходящие в процессе смешения, при этом не учитываются. Это необходимо иметь в виду, особенно при работе со смесями вода/метанол, когда сравниваются результаты изократического разделения в хроматографах с автоматическим смешением растворителей и в таких хроматографах, в которых смесь готовится предварительно в отдельной емкости. Для того чтобы можно было сравнивать значения коэффициента k , объемы всех растворителей следует измерять до смешения.

3.3. Ввод пробы

3.3.1. Общие соображения

Хроматографическое разделение по своей сути является непрерывным процессом, и в свете представлений гидродинамики ввод пробы нарушает равновесные условия в системе. И разработчики хроматографов, и хроматографисты-аналитики должны заботиться о том, чтобы эти нарушения были минимальными. Для сохранения высокой разрешающей способности колонки пробу следует вводить через узкую заглушку. Чтобы результаты количественного анализа были точными, пробы строго определенных объемов необходимо вводить так, чтобы не нарушались равновесные условия.

Кроме того, система ввода пробы должна удовлетворять и ряду других требований.

Необходимо предусмотреть возможность ввода различных объемов пробы. Объем аналитических проб составляет от 0,5 до 20 мкл, а объем препаративных проб — от 0,1 до 5 мл.

При последовательном вводе различных образцов взаимное загрязнение должно быть минимальным.

Должна быть предусмотрена возможность автоматизации. Устройство не должно быть слишком сложным, чтобы с ним нетрудно было работать и чтобы оно было надежным.

Однако разработать систему, одинаково хорошо удовлетворяющую всем перечисленным выше требованиям, достаточно сложно, вследствие чего приборы, которыми располагают хроматографисты, имеют и определенные достоинства, и недостатки. Таким образом, пользователь самостоятельно выбирает систему, наиболее полно отвечающую его требованиям [10, 11].

3.3.2. Типы систем ввода пробы

Системы ввода пробы в ВЭЖХ можно разделить на две группы: в приборах одной группы используется принцип шлюзового устройства, в приборах другой группы — петля для ввода пробы.

3.3.2.1. Системы ввода шлюзового типа. В данном случае ввод пробы осуществляется в виде временного приращения потока, создаваемого при помощи шприца. Подвижная фаза может при этом подаваться с прежней скоростью или останавливаться. При низких давлениях уплотнительным элементом, через который игла шприца вводится в систему, может служить эластичная перегородка. Хроматографы, работающие при более высоком давлении, оснащены специальными уплотняющими приспособлениями и кранами-дозаторами. Системы ввода данного типа использовались в ВЭЖХ на ранней стадии разработки метода, поскольку аналогичная техника ввода пробы обычна для газовой хроматографии. Однако в таких системах ввода трудно обеспечить отсутствие протечек при высоких рабочих давлениях и химическую инертность уплотняющих элементов, и как следствие область применения систем этого типа постоянно сужается.

3.3.2.2. Система ввода типа петли. На рис. 3.11 показана система ввода проб переменного объема. Пробу сначала отмеряют шприцем, а затем вводят через вход 4 6-канального поворотного крана в дозирующую петлю. Эта процедура выполняется при атмосферном давлении. Избыток растворителя, первоначально находившийся в петле, замещается пробой и вытекает через вход 3 в слив. В позиции «Заполнение» подвижная фаза поступает от насоса на колонку через каналы 1 и 6. После переключения крана в положение «Ввод» растворитель направляется через входы 5 и 6 на колонку. Между входами 4 и 5 остается небольшое количество пробы, поэтому перед вводом следующей пробы во избежание ее загрязнения кран необходимо промыть.

В описанной системе ввода образца измерение его количества осуществляется с помощью шприца. Петля обычно заполняется только частично. Правильность работы и точность такой системы при ручном управлении в основном зависят от навыков оператора. Это же относится и к эффекту размывания полосы пробы, наблюдаемому при работе со шприцем и краном. Следовательно, система данного типа должна быть полностью автоматизирована, как это показано на рис. 3.12, поскольку при этом исключаются потенциальные ошибки оператора.

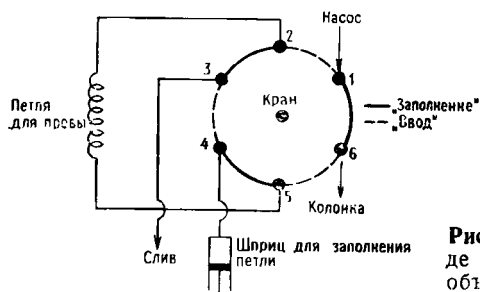


Рис. 3.11. Система ввода пробы в виде петли с изменяемым вводимым объемом.

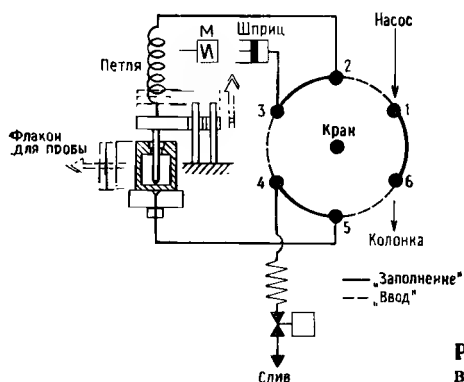


Рис. 3.12. Автоматическая система ввода пробы.

Если управление хроматографом осуществляется вручную, более предпочтителен кран для ввода пробы, петля при этом заполняется целиком, и вся находящаяся в ней проба вводится в колонку. Краны для ввода пробы с внутренними и внешними петлями выпускаются различными фирмами. К числу преимуществ этих устройств относятся также высокая точность и воспроизводимость при ручном управлении, а к числу их недостатков — необходимость смены петель для ввода различных объемов пробы. Кроме того, перед каждым вводом пробы петлю необходимо промывать избытком пробы, чтобы избежать ее разбавления, что является недостатком при работе с малыми количествами анализируемого образца.

3.3.3. Автоматические системы ввода пробы

На рис. 3.12 показана схема автоматической системы ввода пробы, в которой используется петля для ввода пробы. В положении, показанном на рисунке, растворитель поступает непосредственно на колонку, в то время как измерительный шприц подсоединен к флакону с пробой. Дозирующая петля

может оканчиваться прочной иглой, способной перемещаться вверх и вниз под действием пневмопривода. Приводимый в действие электромотором шприц отбирает определенный объем пробы в петлю. После этого иглу поднимают, флакон с пробой убирают, а игла опускается вниз и прижимается к металлическому уплотнению. При переключении крана в положение «Ввод», осуществляемом пневмоприводом или электромотором, поток растворителя направляется по входам 1 и 2 через петлю, вымывая пробу через входы 5 и 6 на колонку. Во время этой процедуры проба может поступать в канал между входами 5 и 4 вследствие диффузии. Во избежание загрязнения пробы кран перед каждой последующей процедурой заполнения петли открывается на очень короткое время и небольшой поток растворителя вымывает остатки пробы из системы через входы 5 и 4.

Система ввода пробы, показанная на рис. 3.12, может быть легко полностью автоматизирована путем добавления устройства, транспортирующего флаконы с пробами в положение, из которого проба отбирается в петлю. Подобные системы, в которых флаконы находятся в штативах или последовательно расположенных держателях, способны принимать 100 и более образцов, анализируемых без участия оператора.

3.4. Хроматографическая колонка

Хроматографические колонки, предназначенные для ВЭЖХ представляют собой снабженные торцевыми соединениями трубки, заполненные тонкозернистым упаковочным материалом (насадкой).

3.4.1. Трубки, используемые для изготовления колонок для ВЭЖХ

Большинство колонок для аналитической ВЭЖХ изготавливают из нержавеющей стали марки 316 — стального сплава, соответствующего стандарту США, определенному Американским институтом стандартов в промышленности (AISI). Этот сплав обладает отличной устойчивостью к коррозии. Все металлические детали хроматографической системы, контактирующие с жидкостью, должны быть сделаны из этого сплава.

Качество обработки внутренних стенок трубки должно отвечать определенным требованиям. Как правило, степень шероховатости стенок, которая определяет качество их обработки, должна быть меньше одной десятой среднего размера частиц материала, заполняющего колонку. Это означает, что шероховатость поверхности должна быть меньше 0,5 мкм, если колонка заполнена носителем с размером частиц 5 мкм.

Чтобы снизить шероховатость трубок, их футеруют стеклом, полимерами, золотом, тем не менее следует отметить, что упомянутые стальные трубки являются вполне удовлетворительными. В последнее время распространение получили стеклянные трубки [12, 13]. Их преимущество — очень высокое качество поверхности стенок. В то же время конструирование торцевых соединений для таких трубок сопряжено с определенными проблемами. Приемлемое решение было предложено фирмой Merck [13].

Фирма Waters [14] использует для изготовления радиально сжимаемых колонок полиэтиленовые трубки. Эти колонки помещают в рубашку, в которой на них подается внешнее давление, что вызывает радиальное сжатие колонок, улучшающее их разрешающую способность и повышающее стабильность.

Для изготовления хроматографических колонок используют трубки внутренним диаметром от 4 до 8 мм, от 2 до 4 мм и от 1 до 2 мм. Колонки первой группы классифицируются как полупрепаративные, второй группы — как аналитические и третьей группы — как микроколонки.

Эти названия колонок определяют область их хроматографического применения. От правильности выбора внутреннего диаметра колонки зависят результаты разделения. Колонки всех перечисленных выше диаметров выпускаются промышленностью.

В условиях ВЭЖХ разделение проводится при повышенном давлении. Вследствие этого из соображений безопасности стенки трубки должны иметь определенную толщину. У наиболее часто используемых трубок диаметром 0,25 дюйма внутренний диаметр равен 4,6 мм, а толщина стенок равна 0,9 мм, что вполне приемлемо. Некоторые фирмы выпускают трубки тех же диаметров, но с большей толщиной стенок, что позволяет делать торцевые соединения непосредственно в трубках (см. далее).

3.4.2. Торцевые соединения колонок

Торцевое соединение колонки и блока фильтра соединяет слой носителя с приборами, используемыми в ВЭЖХ. Основная функция этого устройства — фиксация слоя носителя, на который воздействует высокое давление, и защита от нерастворимых частиц, поступающих с подвижной фазой и способных нарушить его структуру. Кроме того, торцевое соединение должно обеспечивать плавный перенос подвижной фазы из соединительного капилляра (внутренний диаметр от 0,1 до 0,2 мм) в колонку большего диаметра. Таким образом, торцевое соединение с блоком фильтра оказывает определяющее влияние на разрешающую способность колонки. На рис. 3.13

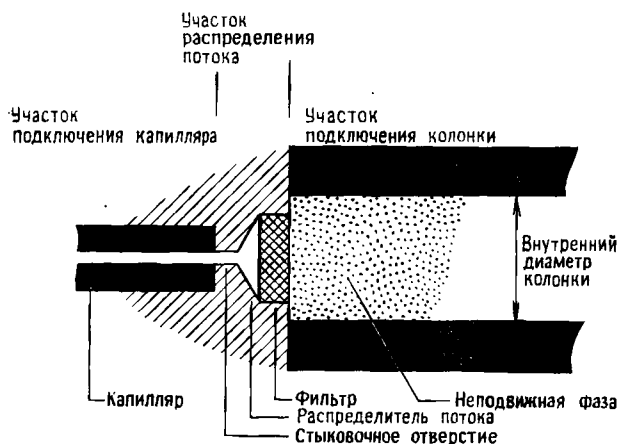


Рис. 3.13. Схема торцевого соединения колонки.

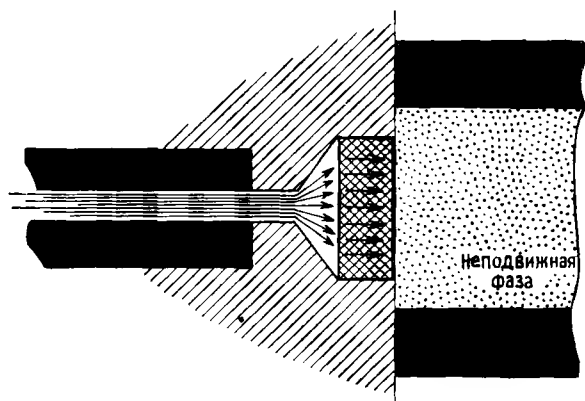


Рис. 3.14. Функция распределителя потока.

приведена схема торцевого соединения, иллюстрирующая его функции.

На схеме соединения можно выделить три узла: узел перераспределения потока, узел подключения колонки и узел подключения капилляра.

На первом из них (рис. 3.14) поток подвижной фазы, содержащий компоненты пробы, переносится из капилляра на носитель колонки через выпускное отверстие, распределитель потока и блок фильтра. Распределитель потока обеспечивает равномерное распределение потока по всей поверхности фильтра.

Конструкция устройства обеспечивает использование всей поверхности фильтра и распределение пробы по всей торцевой поверхности слоя носителя, что позволяет избежать локальной

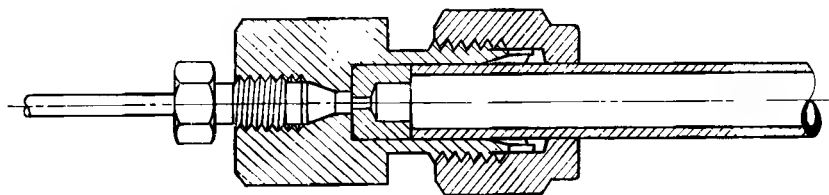


Рис. 3.15. Торцевое соединение колонки в собранном виде (с разрешения Hewlett-Packard Company).

перегрузки колонки, которая возможна, если образец вносится в центр слоя носителя [15]. Тем не менее диаметр фильтра следует выбирать меньше, чем диаметр колонки, чтобы избежать попадания компонентов пробы в менее плотно упакованные пристеночные слои носителя.

Очевидно, что объем выпускного отверстия, перераспределителя потока и блока фильтра должен быть разработан с учетом объема колонки для подавления размывания полос в торцевом соединении. Как правило, мертвый объем торцевого соединения должен составлять менее 1% объема незаполненной колонки. В пределах этих ограничений возможны самые различные варианты конструкций распределителя потока и блока фильтра. Конструкция этого узла подробно изучается с целью ее оптимизации [16, 17].

Предпочтительно, чтобы конструкция входного и выходного соединений была однотипной. Все сказанное выше (см. рис. 3.14) имеет место и для подвижной фазы, покидающей слой носителя. Кроме того, симметричная конструкция допускает обратное направление потока и промывку колонки, что очень удобно для удаления нерастворимых частиц с поверхности фильтра и слоя носителя колонки.

Фильтрующий элемент представляет собой пористый диск (таблетку) из нержавеющей стали марки 316 или лист (мембрану) из пористого тефлона. Вследствие низкой механической прочности такие мембраны применяются совместно с подложкой, представляющей собой металлический экран, который может служить также и распределителем потока. Размеры пор в таблетках и мембранах должны быть меньше самых малых частиц носителя в 5—10 раз (т. е. 2—1 мкм для частиц диаметром 10 мкм).

Поскольку носитель подвергается воздействию высокого давления (до 800 бар в процессе набивки колонки), фильтрующий элемент должен иметь опору. Она представляет собой металлическую деталь, которая называется стыковочным узлом. Одной стороной он стыкуется с внешней частью колонки, а с другой стороны к нему можно присоединить капилляр, как, например, показано на рис. 3.15.

Таблица 3.1. Стандарты соединений капилляров

Внешний диаметр, дюйм (мм)	Фирма-изготовитель (фирменное название)	Детали
1/16 (1,6)	Crawford Fitting Company (Swagelok) Parker Hannifin Valco Rheodyne	Передняя и задняя уплотнительные муфты, расстояние 1,6 мм ^а Уплотнительная муфта, расстояние 1,6 мм ^а Уплотнительная муфта, расстояние 2,5 мм ^а Уплотнительная муфта, расстояние 4,5 мм ^б
1/32 (0,8) (0,6)	Valco Hewlett-Packard	Уплотнительная муфта совместима со стандартным соединением
(0,5)	ANTEK (MICONN)	

^а Расстояние от конца уплотнительной муфты до конца капилляра.

^б Используется только для подключения к дозирующему крану, на другом конце капилляра может находиться система соединения любого из упомянутых выше стандартов.

Именно эта часть колонки и создает, как представляется потребителю, их бесчисленное многообразие. Число различных вариантов систем торцевых соединений практически соответствует числу фирм, выпускающих колонки, так как последние могут различаться внешним диаметром, могут иметь внутреннюю или наружную резьбу для подключения колонки и т. д.

Колонка подключается к системе ввода пробы и к детектору при помощи капилляров. Так как очень часто приходится использовать колонки различного производства, недостаток стандартизации в этой области создает определенные трудности.

Капиллярные соединения, способные выдерживать высокие давления, разрабатываются очень тщательно. Фирма Crawford (Swagelok) разработала систему стандартов для них. К сожалению, существует много вариантов соединений типа Swagelok, которые не полностью соответствуют этим стандартам, поэтому пользователю следует выяснить, какими стандартами руководствуется фирма, выпускающая колонки. В табл. 3.1 сведены данные о наиболее важных стандартах на капиллярные соединения и указаны источники этих сведений.

Следует подчеркнуть, что нельзя использовать попеременно различные капиллярные соединения, так как при этом появляются течи, повреждаются детали соединений и падает производительность.

3.5. Термостат колонки

Температура колонки — один из важных параметров процесса разделения, который влияет на точность и длительность анализа, пределы обнаружения и во многих случаях на селективность разделения.

Следовательно, температура колонки должна быть регулируемой в диапазоне от комнатной до примерно 100°C ; необходимая температура должна поддерживаться с точностью $\pm 0,1\text{—}0,2$ град.; термостатирование колонки должно быть равномерным (не допускаются продольные и радиальные градиенты температуры); в отсек для колонок должны легко устанавливаться колонки различных размеров и краны для их подключения.

В дополнение к информации, приведенной в гл. 2, рассмотрим некоторые практические приемы воздействия на температуру колонки с целью оптимизации ЖХ-анализов (разд. 3.5.1—3.5.3).

3.5.1. Стабильность температуры колонки и точность определения времени удерживания

Согласно данным работы [18], в нормально-фазовой хроматографии коэффициент емкости k изменяется в пределах до 10% при изменении температуры на один градус. Если используется малорастворимый модификатор (типа воды), равновесное распределение модификатора между неподвижной и подвижной фазами устанавливается только при условии, что температура колонки тщательно контролируется. В обращенно-фазовой хроматографии влияние температуры не столь значительно, с изменением температуры на один градус коэффициент емкости меняется на 2—3%, и при этом указанные изменения тем заметнее, чем позднее элюируется соединение [19—21].

3.5.2. Температура колонки и длительность анализа

Во многих случаях изменение температуры колонки можно с успехом использовать как средство ускорения анализа. С повышением температуры коэффициент емкости k разделяемых соединений обычно (хотя и не всегда) снижается. Кроме того, с повышением температуры может возрастать эффективность колонки [22, 23], и одновременно точка оптимальной эффективности сдвигается в область более высоких скоростей подвижной фазы (этот сдвиг представляет практический интерес только для колонок, заполненных частицами размером < 10 мкм). С повышением температуры от комнатной до 70°C

увеличение эффективности может составлять до 20—40%. Одновременное уменьшение значения коэффициента k и увеличение эффективности колонки приводит к значительному увеличению высоты пиков.

При увеличении температуры колонки снижается вязкость подвижной фазы. Поэтому, если имеет место слишком высокое разрешение, анализ можно ускорить путем увеличения объемной скорости подвижной фазы (одновременно задается более высокий верхний предел давления на приборе).

3.5.3. Температура колонки и селективность

Степень влияния температуры колонки на коэффициент емкости k может значительно различаться в зависимости от природы компонентов смеси, и эту зависимость можно с успехом использовать для увеличения селективности разделения. Убедительные примеры этого, демонстрирующие даже изменение порядка элюирования соединений из колонки при умеренных изменениях температуры, приведены в работе [19].

3.5.4. Конструкции термостатов для колонок

Перенос тепла от нагревающих элементов к колонке может осуществляться посредством воздуха, жидкости или путем прямого контакта металлических поверхностей. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки.

а. Наиболее распространены воздушные термостаты, в которых контролируется температура воздуха. Реальная температура носителя и подвижной фазы зависит от интенсивности теплопереноса между циркулирующим воздухом и слоем носителя в колонке и подвижной фазой, осуществляемого через стенки колонки. Таким образом, скорость подачи воздуха, а также природа подвижной фазы и ее объемная скорость оказывают определенное влияние на среднее эффективное значение температуры слоя носителя в колонке.

При работе с термостатами этого типа особое внимание следует уделять вопросам безопасности. Дело в том, что некоторые смеси паров растворителей огнеопасны в широком диапазоне концентраций и имеют низкую температуру самовозгорания (например, диэтиловый эфир 186°C, *n*-гексан 261°C [24]). Ни одна деталь в отделении для колонок, контактирующая с парами растворителей в огнеопасных концентрациях, не должна нагреваться до температуры воспламенения какого-либо из применяемых растворителей. Настоятельно рекомендуется пользоваться нагревателями с низкой температурой поверхности и другими достаточно безопасными устройствами.

Системы с воздушным термостатом отличаются предельной гибкостью: они допускают использование колонок различных

размеров, различных комбинаций колонок и даже возможность размещения детекторов в термостатируемом объеме.

б. Колонка окружена водяной рубашкой, по которой циркулирует вода или другая жидкость. Такое решение, вероятно, создает лучшие условия для теплопереноса через стенки колонки. Тем не менее средняя эффективная температура слоя носителя в колонке по-прежнему зависит от теплопередачи через стенки колонки на носитель и подвижную фазу. Такая система вполне безопасна, но неудобна в работе и обладает малой гибкостью.

в. Колонка упакована в разборный алюминиевый блок, окруженный теплоизоляцией. Температура зависит от теплопереноса из алюминиевого блока на и через стенки колонки в слой носителя и подвижную фазу.

Качество теплового контакта между алюминиевым блоком и колонкой, а также природа подвижной фазы и ее объемная скорость влияют на среднюю эффективную температуру слоя носителя в колонке. Применение термостатов этого типа обычно лимитируется размерами конкретных колонок. Эффективное термостатирование систем подключения колонок, включая краны для подключения, сильно затруднено.

3.5.4.1. Предварительный нагрев подвижной фазы. Как было отмечено выше, при использовании всех обычных типов термостатов следует учитывать, что средняя эффективная температура слоя носителя в колонке зависит от типа подвижной фазы и ее объемной скорости. В работах [25, 26] можно найти некоторые экспериментальные данные о последствиях и величине этих эффектов. Если подвижная фаза, находящаяся при комнатной температуре, поступает на колонку, термостатируемую при повышенной температуре, то в слое носителя возникают осевой и радиальный температурные градиенты, вызывающие падение эффективности колонки и появление зависимости коэффициента емкости k от объемной скорости подвижной фазы. Одновременно среднее значение температуры слоя носителя будет ниже, чем температура термостата, что нарушит сопоставимость результатов измерения коэффициента емкости k , полученного на приборах с термостатами различного типа. Предлагаемая в работе [26] система предварительного подогрева подвижной фазы полностью решает эти задачи.

3.6. Детекторы

Детекторы по-прежнему считаются слабым местом в практической ВЭЖХ. Хотя в разработке чувствительных специфических детекторов достигнут значительный прогресс, детекторов общего назначения (т. е. неспецифических) с приемлемым

нижним пределом обнаружения у хроматографистов все еще нет. Проблема заключается в том, что многие физические и химические свойства подвижной фазы и содержащихся в ней примесей сходны со свойствами обнаруживаемых компонентов пробы. В этой главе мы рассмотрим те из детекторов, которые получили наибольшее распространение.

3.6.1. Некоторые общие понятия

3.6.1.1. Специфические и неспецифические детекторы. Детектор называется специфическим (или разрешающим), если он избирательно реагирует на конкретный тип соединений, которые имеют одно общее характерное свойство, отсутствующее у других (загрязняющих) соединений. Примером такого детектора служит УФ-детектор, измеряющий поглощение в УФ-области. Соответственно неспецифический (или универсальный) детектор реагирует на все (по крайней мере на большинство) соединений, входящих в состав элюата, включая подвижную фазу. Типичный представитель детекторов этой группы — детектор, измеряющий коэффициент преломления.

3.6.1.2. Фактор отклика, нижний предел обнаружения и диапазон линейности. Если какой-либо параметр элюата, проходящего через детектор, например, поглощение УФ-излучения при 254 нм, изменяется на определенную величину ΔA , выходной сигнал детектора также изменяется на величину ΔS . Фактор отклика (или чувствительность) R_D в этом случае определяется как

$$R_D = \Delta S / \Delta A$$

Нижний предел обнаружения (НПО) — это то минимальное изменение определяемого параметра, которое способно вызвать изменение сигнала, достаточное для его надежного распознавания на фоне шумов выходного сигнала. НПО с учетом вводимого образца можно получить только для всей хроматографической системы в целом (включая колонку): НПО представляет собой минимальное количество вещества, вводимого на колонку, которое даст минимальный пик, различимый на фоне шумов, обычно высота такого пика должна вдвое превышать уровень шумов.

НПО, представленный как свойство одного детектора, таким образом, является только характеристикой качества самого детектора. В литературе часто смешивают понятия чувствительности и НПО.

Диапазон линейности (иногда также называемый линейным динамическим диапазоном или динамическим диапазоном)

представляет собой отношение верхнего предела значений измеряемого параметра, для которого выходной сигнал сохраняет линейность в пределах заданного значения (например, 1%), и определенного ранее НПО. Иными словами, диапазон линейности детектора лежит в таких пределах значений измеряемого параметра, для которых фактор отклика R_D постоянен с заданной точностью. Следовательно, диапазон линейности охарактеризован полностью только в случае, если одновременно задан предел допустимых отклонений от среднего фактора отклика.

3.6.1.3. Количественный и качественный отклик детектора.

Одна из целей применения детектора состоит в получении количественных характеристик некоторых или всех компонентов разделяемой пробы. Он может также давать качественную информацию о компонентах пробы. Это имеет место в том случае, когда детектируемый параметр, который избирательно влияет на фактор отклика для конкретных компонентов, может быть изменен, например рабочая длина волн в абсорбционном детекторе, электродный потенциал в электрохимическом детекторе или установка фильтра массы в масс-спектрометре. Для абсорбционных детекторов (УФ- и видимого диапазонов) отношение откликов, полученных при двух и более различных длинах волн, может оказать значительную помощь при идентификации компонентов в дополнение к времени удерживания.

3.6.1.4. Вклад детектора в размывание пиков. В ЖХ существует более или менее эмпирическое правило, иногда называемое железным правилом хроматографии, которое гласит, что эффект размывания пиков вне колонки не должен превышать 10% ширины пика. Существуют два фактора, вносящих вклад в создание этого эффекта: объем ячейки детектора и постоянная времени отклика детектора; верхний предел эффекта можно определить, исходя из эффективности колонки. Соединение с коэффициентом емкости k элюируется из колонки, имеющей n теоретических тарелок и полный мертвый объем $V_M(1+k)$, пиком, объем (по нулевой линии) которого ω_b определяется выражением

$$\omega_b = 4V_M(1+k)/\sqrt{n} \quad (\text{для пика, имеющего гауссову форму})$$

Согласно правилу, приведенному в работе [27], вклад объема ячейки детектора V_D в процесс размывания полосы несуществен, если

$$V_D < 0,1 \omega_b$$

Аналогичный принцип можно использовать для определения верхнего предела значения постоянной времени детектора τ ,

которая не должна превышать одной десятой ширины основания пика (в единицах времени):

$$\tau \leq 0,4 V_M(1+k)/F\sqrt{n}$$

Например, для колонки 10 см×4 мм (внутренний диаметр), заполненной носителем пористостью 0,8, эффективность которой равна 5000 теоретических тарелок, для $k=0,5$ и максимальной объемной скорости 4 мл/мин объем ячейки детектора не должен превышать 10 мкл, а постоянная времени детектора не должна быть более 130 мс.

Следует также обращать внимание на вклад, вносимый в процесс размывания полосы системами подключения и стыками капилляров. При работе с высокоэффективными колонками трубки с внутренним диаметром 0,1—0,15 мм предпочтительнее трубок диаметром 0,25 мм.

3.6.2. Рефрактометрический детектор

3.6.2.1. Общие замечания по применению. Коэффициент преломления (КП) разбавленных растворов изменяется пропорционально изменению концентрации растворенного соединения, что можно использовать для количественного обнаружения последнего в элюате. Зависимость между изменением КП и концентрации соединения в растворе в очень малой степени определяется типом растворенного соединения, что делает этот принцип обнаружения достаточно универсальным, хотя и не слишком чувствительным. Например, при 20 °С и длине волны 589,3 нм КП 0,1%-ного водного раствора сахара (один из популярных примеров) равен 1,3331, а КП чистой воды равен 1,3330. НПО (определенный согласно разд. 3.6.1.2) современного рефрактометрического детектора составляет порядка $1 \cdot 10^{-8}$ Δ ед. КП.

Как правило, при использовании неспецифических (универсальных) методов обнаружения, в том числе и рефрактометрического, теоретическое значение НПО детектора может искажаться рядом побочных эффектов. Температурная зависимость КП растворителей лежит в пределах от 2 до $4 \cdot 10^{-4}$ Δ ед.КП/°С. Влияние давления составляет около $5 \cdot 10^{-5}$ Δ ед. КП/бар [28]. КП жидкости, насыщенной газом (например, воздухом), отличается примерно на 10^{-4} — 10^{-5} Δ ед. КП от значений, полученных для полностью обезгаженных растворителей. Таким образом, работая с системами жидкостной хроматограф — рефрактометрический детектор в областях обнаружения, близких к НПО, следует принимать определенные меры предосторожности. Флуктуации потока с малым периодом (шумы, пульсации или блуждания потока) должны быть меньше 0,01 мл/мин на

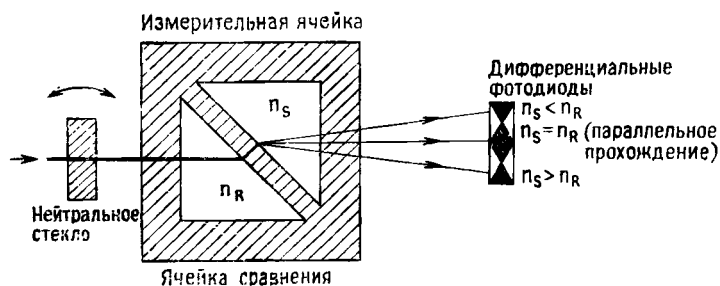


Рис. 3.16. Схема действия рефрактометра, работающего по принципу измерения отклонения луча.

выходе из колонки, не следует также устанавливать на выходе из детектора какие-либо ограничители потока. Колонка должна работать в условиях термостатирования. Капиллярные соединения между колонкой и детектором и сам детектор должны быть защищены от сквозняков и прямого нагрева. Ячейку сравнения детектора (при работе в «статическом» режиме) следует не закрывать внешней петлей, а присоединить к открытой «расширительной емкости», наполненной растворителем. Растворитель должен быть насыщен, например, гелием, и хранить его необходимо при постоянной температуре. Рефрактометрическое обнаружение и градиентное элюирование являются взаимоисключающими.

3.6.2.2. Общие принципы работы рефрактометрических детекторов. В современных рефрактометрических детекторах используется один из трех следующих принципов.

1. Измерение КП путем измерения *отклонения луча* (рис. 3.16): сфокусированный луч света проходит через «нейтральное стекло» (предназначенное для оптической балансировки детектора) — две параллельные призматические выемки в стеклянном блоке, служащие рабочей ячейкой и ячейкой сравнения. Если обе ячейки заполнены одной и той же жидкостью, т. е. если $n_S = n_R$, луч света, покидающий ячейку, слегка смещается вверх параллельно падающему лучу. Если КП в ячейке n_S меняется, выходящий луч тоже меняет свое направление, как показано на рис. 3.16. Положение луча регистрируется дифференциальным фотодиодом и настраивается (с помощью нейтрального стекла) таким образом, чтобы сигнал был сбалансирован, если $n_S = n_R$. Выходной сигнал может быть положительным или отрицательным в зависимости от того, что больше — n_S или n_R . У хороших детекторов этого типа уровень шума равен около $5 \cdot 10^{-9}$ Δ ед. КП.

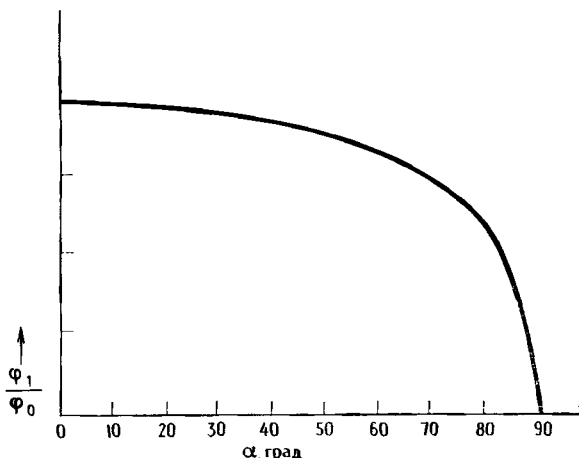
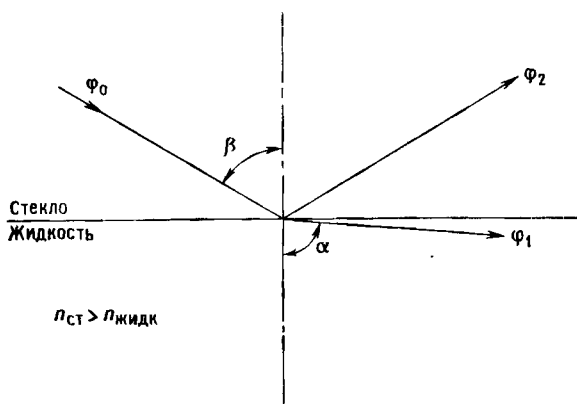


Рис. 3.17. Принцип измерения коэффициента преломления рефрактометром Френеля.

Φ_0 — интенсивность падающего света; Φ_1 — интенсивность света, прошедшего за границу раздела стекло — жидкость (в жидкость); Φ_2 — интенсивность отраженного света. Небольшие изменения $n_{жидк}$ вызывают изменение α и как следствие изменение Φ_1/Φ_0 .

2. Измерение КП в соответствии с законом Френеля (рис. 3.17): луч света, падающий на поверхность раздела двух оптических сред (например, стекло и жидкость), расщепляется на отраженный луч и луч, поступающий во вторую среду (жидкость). Если угол падения подобран таким образом, чтобы угол проникания был близок к 90° (близок к полному отражению), то небольшие изменения коэффициента преломления жидкости вызовут значительные изменения интенсивности проходящего луча (рис. 3.17). Это явление (подробно его описывают уравнения Френеля) используется в рефрактометрическом детекторе, изображенном схематически на рис. 3.18. Два параллельных пучка света направляются один в рабочую ячейку, другой в ячейку сравнения. Небольшие различия в КП образца и жидкости в ячейке сравнения создают

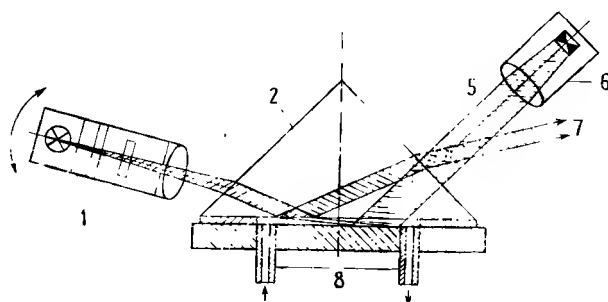


Рис. 3.18. Схема действия рефрактометра Френеля.

1 — источник света; 2 — стеклянная призма; 3 — тефлоновая прокладка с вырезанными для ячейки углублениями; 4 — стальная пластина; 5 — луч света, проникающий в раствор пробы (или раствор сравнения), находящейся в ячейке, и направляемый подирированной поверхностью стальной пластины на фотодетектор 6; 7 — луч отраженного света (не используется); 8 — входной и выходной капилляры.

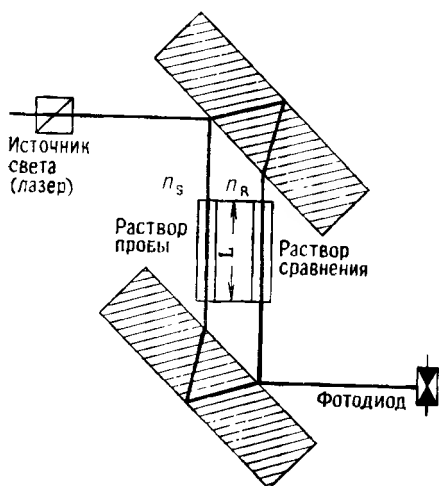


Рис. 3.19. Схема действия интерференционного рефрактометра (рефрактометра Жамина).

L — длина ячеек для раствора пробы и раствора сравнения; $n_{пр}$ и $n_{ср}$ — коэффициенты преломления раствора пробы и раствора сравнения; разность длин оптического пути равна разности фаз двух интерферирующих пучков света: $\Delta\delta = L(n_{пр} - n_{ср})$; интенсивность света, поступающего на фотодиод, меняется от максимума до минимума с изменением $\Delta\delta$ от 0 до $0,5\lambda$.

соответствующее различие в интенсивности света, поступающего из двух ячеек. Уровень шума такого детектора сравним с уровнем шума детектора отклоняющего типа. Если КП элементов существенно различаются, может потребоваться смена призм детектора, что значительно ограничивает его гибкость в работе.

3. Измерение КП методом *интерференции света* (рис. 3.19): длина оптического пути световой щели δ является функцией геометрических размеров щели l и коэффициента преломления оптической среды n_s $\delta = l n_s$, т. е. изменение КП вызовет изменение длины оптического пути. Это явление используется в рефрактометрическом детекторе, схематически изображенном

на рис. 3.19. Один из двух когерентных пучков света проходит через рабочую ячейку, другой — через ячейку сравнения, затем оба пучка накладываются друг на друга и интенсивность света измеряется фотодиодом. Если КП в рабочей ячейке и ячейке сравнения одинаковы, то различия в фазах интерферирующих пучков не наблюдается, и интенсивность света, поступающего на светодиод, максимальна. Если КП образца и жидкости в ячейке сравнения отличаются на Δn , возникает разность фаз двух интерферирующих пучков света: $\Delta\delta = l\Delta n$, что приводит к уменьшению интенсивности света с минимумом при $\Delta\delta = 0,5\lambda$ (λ — длина волны интерферирующего света). Например, при $l = 1$ см и $\lambda = 600$ нм изменения интенсивности света от максимума до минимума вызываются изменением n_s от 0 до $3 \cdot 10^{-5}$ ед. КП. Этот тип рефрактометрического детектора имеет в настоящее время лучший НПО при уровне шумов до $1 \cdot 10^{-9}$ ед. КП. Однако его рабочий диапазон линейности ограничен, так как, если $\Delta\delta$ превысит $0,5\lambda$, интенсивность света вновь начнет возрастать до тех пор, пока $\Delta\delta = \lambda$ и т. д., что делает выходной сигнал неоднозначным.

3.6.3. Абсорбционные детекторы, работающие в УФ- и видимой областях

3.6.3.1. Руководство к применению. В основу количественной абсорбционной фотометрии положен закон Ламберта — Бэра: абсорбция A (логарифм отношения интенсивности падающего света и света, прошедшего через поглощающую среду) раствора пропорциональна концентрации c_s поглощающего вещества, длине оптического пути l и коэффициенту ϵ .

$$A = \epsilon c_s l$$

Применение этого закона связано с соблюдением некоторых ограничений.

а. В пределах ошибки измерения ϵ можно считать постоянной до $c_s = 0,1$ моль/л.

б. «Кажущиеся отклонения» от закона возникают в том случае, если свет, используемый для измерения поглощения, не является монохроматическим (слишком широкая полоса пропускания через монохроматор или слишком много рассеянного света), и спектр поглощающего вещества показывает большое изменение ϵ в зависимости от λ при номинальной длине волны проводимых измерений или вблизи этой волны. В ЖХ ширина полосы пропускания обычно составляет от 2 до 4 нм (или меньше), что позволяет достичь приемлемой линейности (т. е. $\leq 1\%$) в диапазоне до 0,5 (до 1) ед. поглощения. Если для увеличения чувствительности (светового выхода) необходима большая полоса пропускания, следует проверить, со-

храняется ли при этом линейность по крайней мере для тех компонентов проб, которые дают большие сигналы.

в. «Истинные отклонения» от закона, т. е. изменения значения ϵ раствора, которые могут быть вызваны смещением химического равновесия или межмолекулярными силами. Это касается, например, процессов диссоциации и ассоциации, а также степени сольватации. В ЖХ данный эффект возникает в основном в водных растворах, не обладающих буферной емкостью, и (или) при высокой концентрации пробы. Если элюирование ведется подобными подвижными фазами, все процедуры градуировки и анализа пробы должны выполняться при одинаковых значениях рН и ионной силы подвижной фазы и с одинаковыми градиентами состава подвижной фазы, если таковые применяются.

Другие вторичные эффекты, способные повлиять на точность количественных результатов анализа при работе в области НПО, в основном связаны с условиями прохождения подвижной фазы через ячейку детектора.

Поскольку растворитель подвижной фазы в ячейке — это часть оптической системы детектора, изменения его коэффициента преломления (КП) могут влиять на условия прохождения света и тем самым «имитировать» изменения поглощения и вызывать блуждание нулевой линии и ошибки в определении количественных характеристик пиков. Изменения КП подвижной фазы возникают при градиентном элюировании и в результате флуктуаций температуры, а изменения объемной скорости приводят к возмущениям нулевой линии. Возникают как бы локальные завихрения, частота и распределение которых в ячейке зависят от объемной скорости подвижной фазы. Эти возмущения создают «слоистость» (нерегулярные слои с различным КП), которая воспринимается детектором как поглощение. У хороших детекторов такого типа зависимость от объемной скорости меньше $1 \cdot 10^{-3}$ ед. поглощения/мл/мин. О влиянии воздуха (кислорода), растворенного в подвижной фазе, говорилось в разд. 3.2.1.

Следует отметить, что при градиентном элюировании с использованием подвижной фазы с низкой элюирующей способностью может наблюдаться обогащение колонки примесями, содержащимися в растворителе. Эти примеси элюируются из колонки (вместе с компонентами пробы) при увеличении элюирующей способности растворителя. Вода, очищенная перегонкой или обратным осмосом, лучше, чем деионизованная. В тех случаях, когда работа ведется с высокочувствительными детекторами, рекомендуется дополнительная очистка на обращенно-фазовой колонке (большого объема) [29].

Высокое «фоновое» поглощение (т. е. поглощение на длине волны обнаружения, обусловленное подвижной фазой) допол-

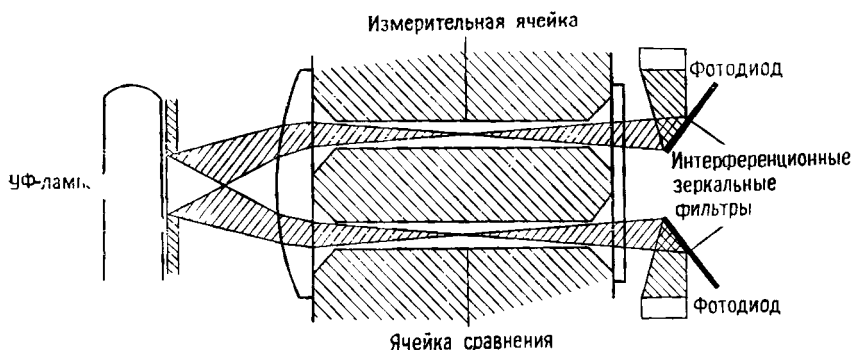


Рис. 3.20. Оптическая схема УФ-детектора с фиксированной длиной волны (с разрешения Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, FRG).

нительно увеличивает шумы нулевой линии, что приводит к уменьшению рабочего диапазона линейности детектора. Несмотря на то что электроника детектора может быть способна «сбалансировать» сигнал до кажущегося нулевого поглощения, детектор по-прежнему «видит» суммарное (т. е. общее) поглощение подвижной фазы и растворенного вещества. Некоторые детекторы способны предупреждать оператора о наличии высокого фонового поглощения.

3.6.3.2. Типы абсорбционных детекторов. Основные компоненты абсорбционного детектора следующие: источник света, фокусирующая оптика, оптический фильтр, одна или две проточные кюветы, оптика фокусирования прошедшего луча, фотодетектор(ы) и электронная схема обработки сигнала. Детекторы можно квалифицировать по конкретным характеристикам этих элементов и их оптической организации.

В детекторах с фиксированной длиной волны используются так называемые линейчатые источники света, т. е. лампы, которые излучают на нескольких дискретных длинах волн (линиях). К наиболее распространенным лампам этого типа относятся ртутная лампа низкого давления, излучающая более 90% света с длиной волны 254 нм (другие линии излучения: 313, 365, 405, 436, 546 и 579 нм). Длины волн меньше 254 нм дают цинковая лампа (214 нм) и кадмиевая лампа (229 и 326 нм). Сочетание лампы и фильтра (вырезающего или отсекающего) определяет фиксированную рабочую длину волны детектора. Большинство типов детекторов позволяют проводить замену фильтра и источника света. Типичная оптическая схема такого детектора показана на рис. 3.20.

К преимуществам детектора с фиксированной длиной волны относятся низкий уровень шума вследствие высокой интенсивности света (на главной полосе излучения лампы), низкая

стоимость инструмента и работы с ним, надежность и простота в обращении. Детектор с ртутной лампой на 254 нм может практически считаться «рабочей лошадкой» рутинной ВЭЖХ. Типичный уровень шума такого детектора составляет $1 \cdot 10^{-5}$ ед. поглощения, средняя стоимость замены лампы от 100 до 200 долл. США, среднее время работы лампы 5000 ч.

В детекторах с переменной длиной волны (ПД) используются источник света с непрерывным спектром излучения и настраиваемый узкополосный фильтр, который называется монохроматором. Наиболее часто используемым в этих целях источником света является дейтериевая лампа, диапазон излучения которой лежит в интервале от 190 до 600 нм и максимум интенсивности — в интервале от 220 до 240 нм. Выше 300 нм интенсивность излучения невысока, поэтому для получения хорошей чувствительности детектора необходимы фильтры с относительно широкой полосой пропускания. Типичное время работы лампы D2 составляет всего от 500 до 800 ч. Имеющая более высокую интенсивность излучаемого света ксеноновая лампа не нашла широкого применения.

Некоторые детекторы этого типа имеют дополнительную, или вспомогательную, вольфрамовую лампу, с которой можно работать при длинах волн выше 350 нм.

Традиционные детекторы с переменной длиной волны представляют собой спектрофотометры (поглощающие в УФ- или видимой области) общего назначения с ручной микрометрической настройкой монохроматора. При работе с детекторами этого типа выбирается такая длина волны, на которой поглощают все интересующие компоненты пробы; изменение установки длины волны в процессе элюирования пробы вряд ли возможно (в нормальных условиях количественного анализа).

В последние годы были разработаны новые модели таких детекторов, предназначенные специально для ВЭЖХ, которые позволяют проводить быструю автоматическую смену длины волны за 1—2 с или менее во всем рабочем диапазоне длин волн, обычно от 190 до 600 нм. Примеры оптических схем двух таких детекторов с быстрой автоматической сменой длин волн показаны на рис. 3.21 и 3.22. Детекторы этого типа позволяют оператору программировать во времени ряд смен длины волны, осуществляемых в процессе хроматографического анализа (преимущественно в интервалах между элюированием отдельных компонентов). Это означает, что установку длины волны можно индивидуально оптимизировать с целью увеличения селективности обнаружения или снижения предела обнаружения (или и для того, и для другого) для нескольких или всех интересующих компонентов пробы. В идеале автоматическая установка длины волны и автоматическая корректировка нулевой линии детектора сопряжены с работой интегратора таким

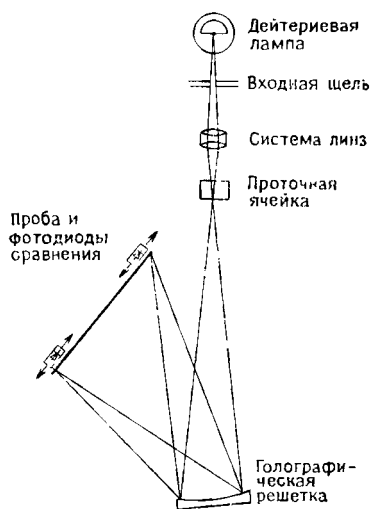


Рис. 3.21. Оптическая схема детектора с переменной длиной волны и устройством для ее быстрой автоматической смены (с разрешения Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, FRG).

Для выбора необходимой длины волны два фотодиода смещают независимыми шаговыми электродвигателями по поверхности (сфере), на которую проецируется изображение спектра.

образом, что детектор при выполнении очередного шага временной программы смены длин волн ожидает, пока происходит элюирование пика и пока интегратор не зарегистрирует его окончание. При работе в таком режиме программирование длин волн можно также использовать для анализа хромато-

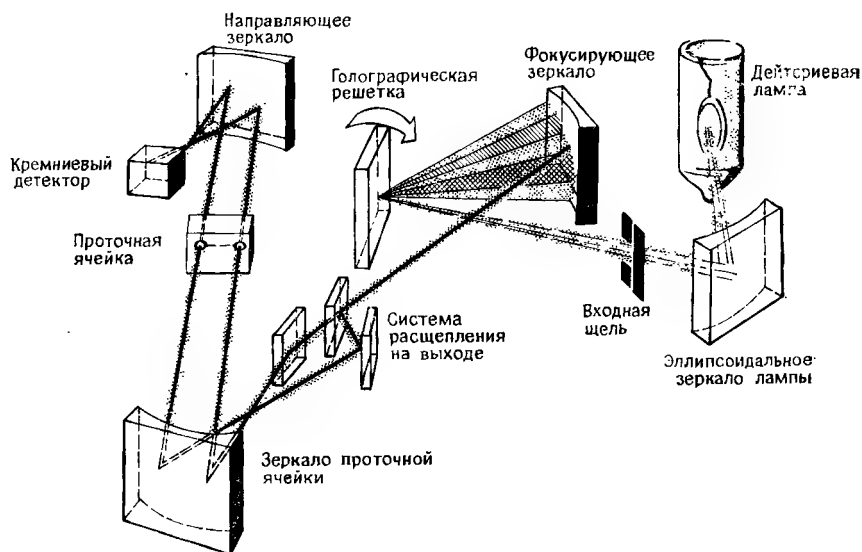


Рис. 3.22. Оптическая схема детектора с переменной длиной волны и устройством для ее быстрой автоматической смены (с разрешения Beckman Instruments Co.).

Для выбора необходимой длины волны монохроматор быстро поворачивается с помощью приводного механизма.

грамм, содержащих большое количество пиков, без риска упустить какую-либо важную качественную информацию.

Программируемые детекторы данного типа могут также применяться для снятия УФ-спектров отдельных элюируемых веществ и (или) измерения отношений поглощения (т. е. отношения поглощения элюируемого вещества на различных длинах волн). Эта информация может быть очень полезной в качестве доказательства идентичности пиков. Примеры того, как эти характеристики могут быть использованы в практике ВЭЖХ, обсуждены в работе [30].

Последнее достижение в этой области — разработка детектора с гребенкой диодов (ДГД). Линейная гребенка фотодиодов представляет собой кремниевую основу, на которой методами полупроводниковой технологии в одну линию длиной примерно 2 см нанесено большое количество (от 200 до 1000) крошечных фотодиодов. Каждому фотодиоду соответствует встроенное считывающее устройство, основу которого составляет конденсатор, заряженный до определенного напряжения и разряжающийся через фотодиод в течение промежутка времени между процессом разрядки и считывания. Напряжения (токи) разряда периодически измеряются (и конденсатор перезаряжается) через определенные временные интервалы, например 10 с, давая практически одновременную информацию об интенсивности света, поступившего на каждый фотодиод за этот промежуток времени.

Как показано на оптической схеме такого детектора (рис. 3.23), спектр поглощения элюата в кювете детектора отображается на гребенке диодов. Таким образом, в течение каждого интервала считывания сигнальной электронике передается полный спектр с разрешением, определяемым спектральным диапазоном (и шириной входной щели) элемента, рассеивающего свет по ширине гребенки (например, от 200 до 600 нм), и числом диодов, составляющих гребенку (например, 200). Подробная информация о принципах действия спектрометра с линейной гребенкой диодов дана в работе [31].

Очень быстрое квазипараллельное и квазинепрерывное получение полного УФ/ВИД спектра поглощения пробы (при условии что детектор имеет соответствующую мощную сигнальную электронику) дает значительную дополнительную информацию об элюате, выходящем из колонки, получение которой было бы трудоемким и потребовало бы много времени при работе с обычным УФ-детектором. Используя подходящий графический экран, можно получать трехмерные записи хроматограмм при обнаружении на различных длинах волн, позволяющие быстро сделать вывод об оптимальной для обнаружения длине волны для каждого пика на хроматограмме. «Мгновен-

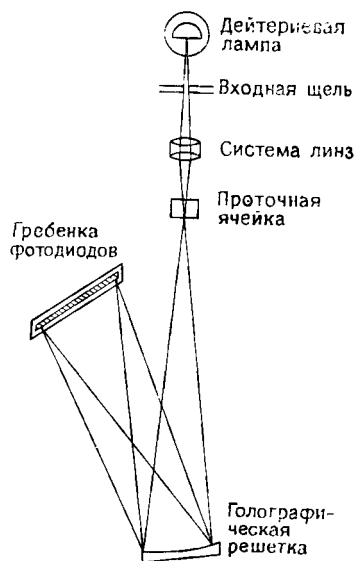


Рис. 3.23. Оптическая схема детектора с линейной гребенкой фотодиодов (ДГД) (с разрешения Hewlett-Packard GmbH, Waldbronn, FRG).

ная» запись спектров с различным положением одного и того же пика может показать, соответствует ли этот пик чистому компоненту пробы. Аналогичную информацию по всей хроматограмме можно получить путем непрерывной записи соотношений поглощения. Сопоставление легко получаемых спектров отдельных пиков или всех пиков, представляющих интерес, с хроматограммой (или хроматограммами) проб облегчит идентификацию компонентов и поможет подтвердить идентичность составляющих пробы. Путем выбора большего диапазона обнаружения (усредняя сигналы нескольких фотодиодов) можно улучшить соотношение сигнал/шум, что, однако, приводит к снижению линейности отклика, как указывалось в разд. 3.6.3.1, б. Другой путь улучшения соотношения сигнал/шум — усреднение сигнала за несколько или даже много интервалов считывания; при этом соответственно увеличивается постоянная времени детектора с возможными изменениями качества разрешения хроматограммы (разд. 3.6.1.4).

3.6.4. Флуориметрический детектор

Флуориметрическое обнаружение, несмотря на ряд преимуществ по сравнению с абсорбционным обнаружением, в частности по пределу обнаружения и специфичности во многих

ЖХ-приложениях, до сих пор не получило того широкого применения, которое оно заслуживает. Поэтому нам хотелось бы подчеркнуть достоинства этого метода.

3.6.4.1. Некоторые общие рекомендации по применению. Количество флуоресцентного света, излучаемого возбужденными молекулами в разбавленном растворе, пропорционально а) интенсивности источника возбуждающего излучения; б) объему освещаемого раствора пробы (в данном случае длина оптического пути должна быть минимальной, что требует абсолютно иной геометрии ячейки, чем в абсорбционном детекторе); в) квантовой эффективности флуоресценции пробы (отношение излучающего и неизлучающего энергетических переходов из возбужденного состояния в нормальное может быть оптимизировано путем подбора соответствующих условий возбуждения); г) концентрации раствора обнаруживаемого соединения.

Флуоресцентное (и фосфоресцентное) излучение испускается из (облучаемого) образца во всех направлениях. В идеальном случае это излучение следовало бы собирать сферическим зеркалом, помещенным вокруг ячейки с образцом. Однако это зеркало не должно собирать свет, поступающий непосредственно от источника возбуждающего излучения.

Перечислим некоторые факторы, способные исказить результаты измерения флуоресценции.

Растворенный кислород (см. также разд. 3.2.1) или другие содержащиеся в элюенте примеси, способные вызывать гашение флуоресценции.

Рассеянный свет (от источника возбуждающего излучения), возникающий вследствие наличия в элюате крупных молекул других рассеивающих излучение частиц или вследствие наличия красителей и т. д. на поверхности рабочей ячейки детектора или в других участках оптической схемы; светорассеяние можно заметить по увеличению уровня шумов и сокращению динапозона линейности выходных характеристик детектора.

Существует несколько способов увеличения квантового выхода флуоресценции и фосфоресценции.

Длину волны возбуждающего излучения следует выбрать таким образом, чтобы образовывалось максимальное количество молекул в возбужденном состоянии (триплетном), а возврат в нормальное состояние происходил в основном в результате излучения.

Использование мицеллярных растворов для индуцирования фосфоресценции (при комнатной температуре) [32].

Добавление в элюат соединений (например, диацетила), молекулы которых способны переходить в триплетное состояние в результате (неизлучающего) переноса энергии от возбужденных молекул образца; в дальнейшем измеряется фосфоресцент-

ное излучение, возникающее в результате спонтанного перехода молекул «акцептора» в основное состояние [35].

3.6.4.2. Источники возбуждающего излучения. В принципе в флуориметрических детекторах можно использовать любой источник света с фильтром (или монохроматором), пригодный для абсорбционной фотометрии. Фокусирующая оптика, однако, должна удовлетворять требованиям, предъявляемым геометрией ячейки флуориметрического детектора. Это означает, что освещение данного объема образца (ограниченного по соображениям минимального размывания полосы вещества) должно проводиться по наиболее короткому световому пути. В тех случаях, когда необходимо предельно понизить нижний предел обнаружения, следует применять фильтр, дающий максимально возможное светопропускание на выбранной длине волны возбуждающего излучения (а не с самой узкой полосой пропускания), и максимально снизить интенсивность излучения с большей длиной волны, особенно в области полосы пропускания эмиссионного фильтра. Источники излучения высокой интенсивности типа ксеноновых ламп создают хорошие условия для измерения флуоресценции при условии отсутствия шумов, причины возникновения которых описаны в разд. 3.6.3.2. В литературе обсуждается возможность использования в качестве источников возбуждающего излучения для флуориметрического обнаружения лазеров [34] и ^{63}Ni -ламп [35].

3.6.4.3. Измерение испускаемого излучения. В идеальном случае флуоресцентное излучение, возникающее в результате соответствующего возбуждения молекул пробы, измеряется относительно темного фона. Таким образом, основной источник шумов детектора — это шум, возникающий в результате темнового тока фотоприемника, который в основном зависит от температуры. Как правило, увеличение температуры фотодиода на 10°C удваивает шумы, возникающие вследствие темнового тока.

Шум (пропорциональный корню квадратному из значения интенсивности излучения), являющийся основной помехой при абсорбционном обнаружении при флуориметрическом обнаружении, можно не принимать во внимание. Таким образом, нижний предел обнаружения соединений, имеющих высокую квантовую эффективность флуоресценции, при флуориметрическом обнаружении может быть на порядок лучше, чем при абсорбционном.

В флуоресцентной спектроскопии находят применение детекторы на основе линейных гребенок фотодиодов (см. также разд. 3.6.3.2) и полупроводниковых фотоумножителей, которые в будущем найдут применение и в ЖХ [36—38].

3.6.5. Электрохимические детекторы

Детекторы, основанные на применении электроаналитических методов, становятся в последние годы все более популярными. И это имеет свои причины (см. далее). Так, например, эти детекторы предпочтительны в анализе микропримесей и в ионной хроматографии.

Поскольку электроанализ представляет собой большой набор дисциплин, необходимо провести классификацию методов, используемых для обнаружения в ВЭЖХ. Мы различаем следующие типы детекторов: а) реагирующие на изменения параметров элюата и б) реагирующие на отдельные компоненты элюата.

Детекторы первого типа реагируют на изменения электрохимических свойств всей жидкости, проходящей через измерительную ячейку детектора. Изменения электропроводности подвижной фазы, регистрируемые в виде изменения сопротивления ячейки, и изменения диэлектрической проницаемости протекающей жидкости [39—41], регистрируемые в виде изменения электрической емкости ячейки, положены в основу двух наиболее распространенных электроаналитических методов обнаружения изменений электрохимических параметров элюата. В частности, особое значение в последние годы приобрел кондуктометрический детектор. Этот детектор в комбинации с так называемыми компенсационными колонками дает очень гибкую систему, пригодную для хроматографии ионов.

Электрохимические детекторы второго типа, регистрирующие отдельные растворенные вещества, реагируют на изменения разности потенциалов (потенциометрия) или тока (вольтамперометрия или кулонометрия) при прохождении анализируемого соединения через ячейку детектора. Потенциометрический принцип обнаружения не получил широкого распространения в ВЭЖХ [42, 43], поскольку характеризуется слишком высоким значением нижнего предела обнаружения. Однако при тщательной разработке конструкции электрода возможно создание детектора с очень высокой избирательностью.

Большая часть электрохимических детекторов основана на вольтамперометрическом или кулонометрическом методе обнаружения анализируемого соединения в потоке жидкости. Главное условие получения сигнала детектора — наличие электрофора (по аналогии с хромофором в фотометрическом детектировании) в молекуле изучаемого вещества. Электрофор представляет собой структуру (или субструктуру) в молекуле, которая способна легко принимать (восстанавливаться) или отдавать электроны (окисляться) в определенных условиях (и при определенном потенциале). Таким образом, при применении вольтамперометрического и кулонометрического ме-

тодов обнаружения в ВЭЖХ регистрируется изменение тока, протекающего через ячейку, обусловленное изменением концентрации анализируемого соединения.

Потенциометрические детекторы не поступают в продажу, тогда как вольтамперометрические и кулонометрические детекторы производятся многочисленными фирмами. Поэтому более подробно мы рассмотрим детекторы двух последних типов, а также кондуктометрический детектор.

3.6.5.1. Кондуктометрические детекторы. Общие принципы.

При создании разности потенциалов находящиеся в растворе ионы начинают перемещаться к электродам, имеющим противоположный их собственному заряд. Проводимость — величина, обратная электрическому сопротивлению, — зависит непосредственно от числа заряженных частиц в растворе. Эта зависимость положена в основу количественных измерений в кондуктометрии. В то же время следует четко представлять, что данный метод имеет ряд внутренних ограничений. Для объяснения этого следует рассмотреть ряд основных соотношений.

Проводимость раствора G есть величина, обратная его электрическому сопротивлению:

$$G = 1/R_E$$

По аналогии с сопротивлением электрического проводника удельную проводимость можно определить как

$$G = \kappa (A/l) = \kappa \cdot \text{константа ячейки}$$

где A — площадь поверхности электродов и l — расстояние между ними. Таким образом, именно удельная проводимость κ является параметром, зависящим от концентрации. Соотношение A/l , называемое константой ячейки, определяется только ее геометрией. Если необходимо определить абсолютные значения проводимости, константу ячейки можно установить, используя стандартные растворы с известным значением κ . Если кондуктометр используется как детектор в ВЭЖХ, абсолютные значения проводимости не требуются.

Подвижность ионов будет различаться в зависимости от их размеров, заряда и поляризуемости. Она зависит от молярной проводимости Λ , определяемой как проводимость раствора одного грамм-эквивалента вещества, помещенного между электродами, находящимися на расстоянии 1 см. Переводя единицы в одну систему измерения, получаем

$$\Lambda = 1000 \kappa / c$$

Объединим выражения для G и Λ :

$$G = \text{константа ячейки} \cdot \Lambda c / 1000$$

Таким образом, для получения количественных результатов при проведении разделения методом ВЭЖХ с использованием кондуктометрических детекторов молярная проводимость должна быть постоянной. Это справедливо только для очень разбавленных растворов. Только в этом случае подвижность ионов определяется величиной электрического поля и силами трения в жидкости. Молярная проводимость бесконечно разбавленных растворов Λ_0 — это специфическая характеристика соединения. Однако в растворах конечной концентрации становятся значительными электрофоретический перенос в обратном направлении и релаксационные процессы, и Λ зависит от концентрации. В присутствии буферных ионов изменение проводимости, обусловленное наличием анализируемого вещества, может, таким образом, оказаться в значительной степени замаскированным.

В хроматографии это может привести к важным последствиям, так как, чтобы точно регистрировать профиль концентрации элюируемого компонента, детектор должен обладать постоянной, не зависящей от концентрации чувствительностью. К счастью, концентрация пробы обычно бывает значительно ниже 10^{-3} моль/л. Учитывая, что на колонке в соответствии с ее размерами, фактором емкости и числом теоретических тарелок происходит дополнительное разбавление пробы в 5—50 раз, вполне допустимо считать, что молярная проводимость анализируемых ионов постоянна.

Следует всемерно стремиться к подавлению эффектов, создаваемых буферными ионами подвижной фазы. Поскольку вода в большинстве случаев непригодна в качестве подвижной фазы для разделения ионов, отказаться от буферных растворов не представляется возможным. Следовательно, необходимо выбирать подвижную фазу с минимально допустимой концентрацией буферных компонентов. Очень красивое решение этой дилеммы описано Смолем и др. [45]: путем остроумного подбора состава буфера подвижной фазы и так называемой компенсационной колонки буферные ионы после проведения процесса разделения на рабочей колонке практически полностью удаляются подсоединенной последовательно компенсационной колонкой.

Принципы измерения. В отличие от описанных в следующем разделе электрохимических детекторов при применении детекторов данного типа следует избегать протекания так называемых гальванических процессов на поверхности электродов, т. е. электрохимических реакций. Поэтому используются источники переменного тока с частотой от 50 до 1000 Гц и напряжением от 5 до 10 В. Кроме того, поверхность электродов платинируется, что повышает их поляризуемость и емкость и соответственно снижает до минимума фарадеевы токи.

Подвижность ионов сильно зависит от температуры. Со-

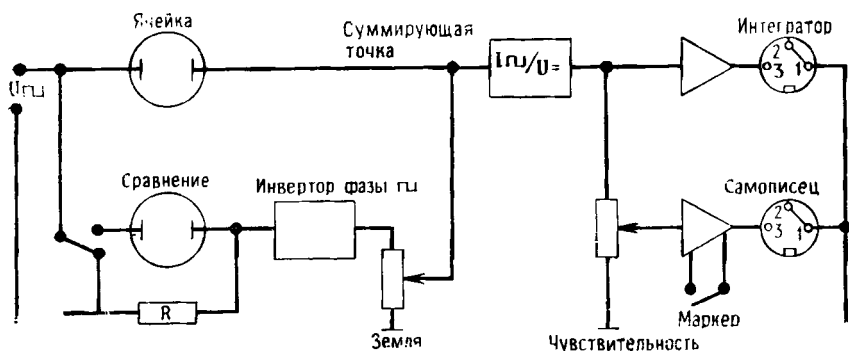


Рис. 3.24. Блок-схема современного кондуктометрического детектора для ВЭЖХ (с разрешения Dr. H. Klawer Berlin/FRG).

гласно литературным данным, коэффициент температурной зависимости составляет до 2%/град. Высокие требования к точности и воспроизводимости детекторов, необходимые в ВЭЖХ, могут быть удовлетворены путем введения в измерительную цепь ячейки сравнения, которую можно заполнить подвижной фазой и герметично закрыть либо прокачивать через нее подвижную фазу непрерывно. Сигналы, полученные с рабочей ячейки и ячейки сравнения, могут служить для уравнивания двух преобразователей.

Измерения проводятся с применением моста сопротивлений Уитстона или просто в соответствии с законом Ома. Схема устройства, основанного на последнем принципе, приведена на рис. 3.24.

Рекомендации по применению. Совершенно очевидно, что детекторы данного типа наиболее пригодны для определения заряженных соединений в элюате. Несмотря на то что многие из этих соединений (органические и неорганические ионы) имеют полосу поглощения в УФ-области спектра, работа со спектрофотометрическими детекторами в области коротких длин волн сопряжена с множеством неудобств. Кондуктометрические детекторы для ВЭЖХ представляют отличный и экономичный способ обнаружения, который особенно предпочтителен для определения малых концентраций ионов. Методика удаления буферных ионов подвижной фазы, предложенная Смолем и др. [45], в значительной мере способствовала развитию этой области. В настоящее время в продажу поступают системы (Dionex), специально разработанные с учетом требований ионного анализа.

3.6.5.2. Вольтамперометрические и кулонометрические детекторы. Общие принципы. Для объяснения принципа дейст-

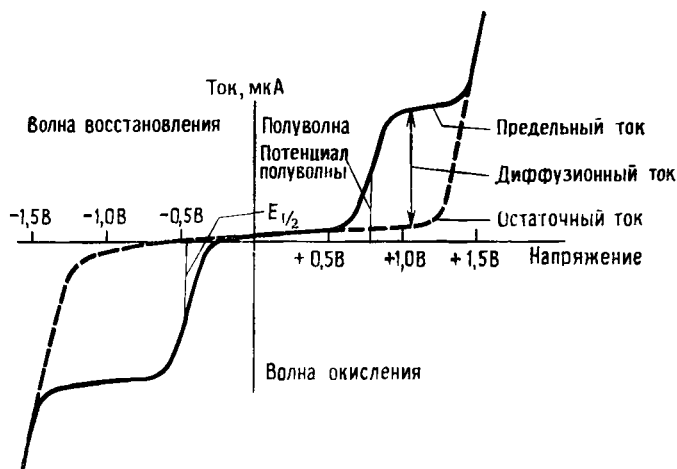


Рис. 3.25. Вольтамперограмма электроактивного соединения, на которой видны волна восстановления и волна окисления.

— — — зависимость тока от напряжения в отсутствие электроактивного анализируемого вещества.

вия детекторов этого типа на рис. 3.25 приведена типичная зависимость (ток — потенциал) для электроактивного соединения в статических (т. е. в ячейке) условиях. Эта кривая называется вольтамперограммой (или полярограммой, если она получена с помощью ртутного капаящего электрода). Картина не изменится, если раствор протекает через ячейку, как в случае ВЭЖХ. Получаемая при этом кривая называется гидродинамической вольтамперограммой, и ее единственное отличие от вольтамперограммы заключается в невозможности ее непрерывной регистрации.

Характерная особенность вольтамперограммы — наличие участка тока, на котором сила тока после резкого увеличения практически не меняется с изменением приложенного напряжения. Этот ток называется предельным.

В связи с практически мгновенным электрохимическим превращением, происходящим на границе раздела электрод — раствор, возникает градиент концентрации, противоположный направлению диффузии анализируемых молекул к электроду. Однако диффузия протекает сравнительно медленно, в результате чего устанавливается равновесие, при котором величина тока ограничивается скоростью переноса электроактивных веществ на электрод. Величина такого диффузионного тока пропорциональна концентрации анализируемых веществ и геометрическим параметрам ячейки. Эту зависимость можно выразить количественно путем решения уравнений массопереноса

для ячейки. Уравнения Ильяковича для некоторых типов ячеек вольтамперометрических детекторов рассмотрены в работе Ханекампа и др. [46].

Из рис. 3.25 видно, что в величину предельного тока вносит вклад раствор электролита подвижной фазы (остаточный или фоновый ток). Диффузионный ток представляет собой разность между предельным и фоновым токами. На количественные измерения методом вольтамперометрии влияет, таким образом, величина диффузионного тока, который можно измерить при наличии остаточного или фонового тока. Следует помнить о том, что фоновые токи в электрохимических детекторах для ВЭЖХ могут в ряде случаев в 1000 и более раз превышать диффузионные.

Другая характерная особенность вольтамперограммы — так называемый потенциал полуволны, или такое значение потенциала, при котором ток равен половине величины диффузионного тока в данных конкретных условиях эксперимента, что также можно использовать для получения количественной информации.

В ВЭЖХ с электрохимическим обнаружением или в электрохимическом анализе, основывающихся на использовании амперометрических методов, в ячейке детектора создается такая разность потенциалов, при которой достигается предельный ток для какого-то ряда или класса анализируемых соединений. Амперометрические детекторы, в которых применяется капающий ртутный электрод, называются полярографическими детекторами.

Анализируемые соединения в вольтамперометрических детекторах претерпевают минимальные электрохимические превращения. Степень превращения составляет всего от 1 до 3%. Однако возможно создание ячеек, степень превращения в которых достигает 100%. Детекторы такого типа называются кулонометрическими. Ограничения, связанные с массопереносом, в этом случае удастся обойти путем уменьшения пути диффузии соединения, например используя пористый электрод с развитой поверхностью, покрытой тонкой пленкой жидкости (<50 мкм) [47].

Если считать, что степень превращения соединения в кулонометрическом детекторе постоянна и реакция протекает количественно, то регистрируемый ток пропорционален потоку анализируемого соединения (моль/с). Такой детектор определяет абсолютное количество соединения, тогда как вольтамперометрический детектор определяет его концентрацию в растворе.

Сравним теперь характеристики амперометрических и кулонометрических детекторов для ВЭЖХ (табл. 3.2).

Таблица 3.2. Свойства амперометрических (с твердыми электродами) и кулонометрических детекторов для ВЭЖХ

Амперометрические детекторы	Кулонометрические детекторы
Измеряют концентрацию (моль/л) Изменение объемной скорости влияет на площади пиков Величина сигнала возрастает с увеличением объемной скорости Пассивирование поверхности электродов быстро снижает величину сигнала Шумы <10 пА Фоновый ток от 10 до 100 нА	Измеряют количество (моль) Изменение объемной скорости не влияет на площади пиков Величина сигнала уменьшается с увеличением объемной скорости Пассивирование поверхности электродов постепенно влияет на величину сигнала Шумы 1 нА Фоновый ток от 1 до 10 мкА

Поскольку амперометрические детекторы чувствительны к концентрации, площади пиков изменяются с изменением объемной скорости элюента. Поэтому для достижения высокой чувствительности при работе с этими детекторами в первую очередь необходимо поддерживать строго постоянную объемную скорость. Кроме того, величина сигнала амперометрического детектора, т. е. высота пика, возрастает с увеличением объемной скорости. Это понятно, так как толщина диффузионного слоя, который формируется за миллисекунды, пока анализируемое соединение протекает по поверхности электрода, уменьшается с увеличением объемной скорости. Расход электроактивного вещества восполняется быстрее, в результате чего большее количество вещества, поступившего на границу раздела электрод/жидкость, может претерпевать превращения (рис. 3.26). Пример этого явления приведен в работе [48].

На практике этот эффект маскируется зависимостью ширины пика от объемной скорости и совместным влиянием внешнего размывания полос, скорости протекания электрохимического процесса и быстрого действия электроники.

У кулонометрических детекторов величина сигнала уменьшается с увеличением объемной скорости в результате снижения эффективности электрохимического процесса, обусловленного сокращением времени пребывания вещества в электрохимической ячейке детектора (рис. 3.27) [47].

Пассивирование поверхности электродов вследствие необратимой адсорбции составляющих подвижной фазы или продуктов электрохимической реакции вызывает снижение величины сигнала амперометрических детекторов. Это создает неудобства при получении количественных результатов, так как обязательной становится градуировка с использованием внутренних стандартов. Применение внутренних стандартов в ряде

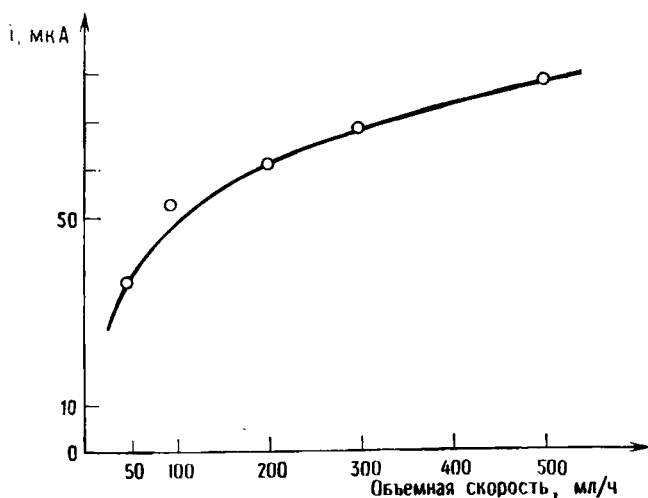


Рис. 3.26. Зависимость величины сигнала амперометрического детектора от объемной скорости (с разрешения Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam).

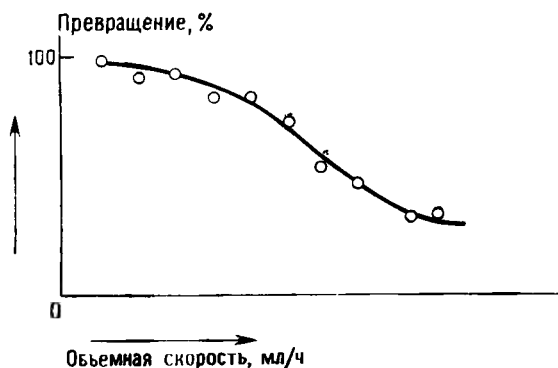


Рис. 3.27. Зависимость степени превращения соединения в кулонометрическом детекторе от объемной скорости (с разрешения Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam) [47].

случаев является весьма желательным, например при контроле эффективности экстракции соединения из биологических проб или при недостаточной точности ввода проб, но оно может иметь ряд серьезных ограничений. Кроме того, пассивирование электродов вызывает постепенный дрейф нулевой линии. Тщательная очистка (так называемая полировка) поверхности электродов достаточно эффективно восстанавливает первоначальную величину сигнала детектора и обеспечивает горизонтальность нулевой линии. Однако эти требования несовместимы с условиями проведения рутинных анализов, поэтому в работе [49] предлагаются различные способы борьбы с пассивированием электродов. Вследствие значительно больших пло-

щадей поверхности электродов кулонометрические детекторы не столь чувствительны к пассивированию электродов.

Последние две характеристики из числа приведенных в табл. 3.2 будут рассмотрены позднее.

Конструкция ячейки и материалы для изготовления электродов. Чтобы какой-либо преобразователь можно было назвать электрохимическим измерительным устройством, он должен как минимум иметь два электрода, между которыми создается разность потенциалов. В амперометрии и кулонометрии эта разность потенциалов поддерживается на постоянном уровне. Тот электрод, на котором протекает интересующая исследователя реакция, называется рабочим (р.э.), а другой — электродом сравнения (э.с.). Один из них служит катодом, т. е. на нем протекают реакции восстановления, другой — анодом, т. е. на нем протекают соответственно реакции окисления.

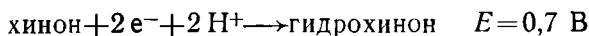
Согласно определению, потенциал ячейки находят по разности потенциалов между катодом и анодом:

$$E_{\text{яч}} = E_{\text{к}} - E_{\text{а}}$$

Если эта разность положительна, реакция — с учетом некоторых ограничений — может иметь место, и ячейка функционирует как гальванический элемент (вырабатывающий ток). Если же разность отрицательна, то для проведения реакции на электродах необходимо подать потенциал $E_{\text{пр}}$, больший или равный $E_{\text{яч}}$. Ячейка в этом случае является электролитической.

Поясним сказанное на примере.

Допустим, что нам необходимо обнаружить гидрохинон методом электрохимического окисления. В этом случае р.э. служит анодом, а э.с. — катодом. Из известных значений стандартного потенциала полуреакции



и уравнения Нернста можно вычислить потенциал анода. Поскольку катодом служит электрод сравнения, его потенциал известен. На практике используют всего несколько хорошо изученных электродов сравнения (в данном примере $\text{Ag}|\text{AgCl}$).

Теперь можно рассчитать потенциал ячейки, например:

$$E_{\text{яч}} = E_{\text{к}} - E_{\text{а}} = E_{\text{э.с.}} - E_{\text{р.э.}} = -0,47 \text{ В}$$

Таким образом, $E_{\text{пр}} \geq -(E_{\text{к}} - E_{\text{а}}) = 0,47 \text{ В}$. Однако так как в ячейке происходит химическая реакция, то через нее протекает ток, обусловленный перемещением ионов (см. разд. 3.6.5.1). Возникающее в ячейке соответствующее сопротивление этому перемещению в свою очередь увеличивает реальный потенциал ячейки:

$$E_{\text{я}} = E_{\text{э.с.}} - E_{\text{р.э.}} - iR$$

$$\text{и } E_{\text{пр}} \geq -(E_{\text{э.с.}} - E_{\text{р.э.}} - iR)$$

где i — ток, протекающий через ячейку, а R — ее внутреннее сопротивление.

Падение напряжения, равное iR , должно быть минимальным. Этого несложно достичь, используя проводящие элюенты. Поэтому не вызывает удивления тот факт, что с расширением области применения обращенно-фазовой хроматографии электрохимические методы обнаружения в ВЭЖХ становятся все более популярными.

Итак, мы считаем, что э.с. в данном случае выполняет функции катода для поддержания тока в ячейке. Электрохимическая реакция, протекающая на поверхности э.с., изменяет его характеристики. Поскольку э.с. должен осуществлять функции сравнения относительно р.э., то в условиях протекания реакции поддерживать постоянное напряжение на р.э. достаточно сложно. Поэтому в большинстве электрохимических детекторов имеется третий, вспомогательный электрод (в.э.), который проводит основную часть тока. Электрод сравнения, через который фактически проходит очень малый ток, может иметь высокое внутреннее сопротивление и небольшие размеры. Разность потенциалов между р.э. и э.с. в этом случае гораздо легче поддерживать постоянной, поскольку потенциал э.с. постоянен.

Помимо чисто электрохимических соображений при разработке конструкции ячейки необходимо руководствоваться условиями хроматографии и типом используемых колонок. В частности, размеры ячейки, время отклика электродов и электронной схемы должны позволять фиксировать малые объемы и быстро меняющиеся профили концентрации, которые создаются современными высокоэффективными колонками.

Таким образом, необходимы малые (<5 мкл) объемы ячеек, хотя это необязательно означает малые геометрические размеры, как в спектрофотометрических детекторах. Очень малым должен быть объем, в котором происходит обнаружение, т. е. объем отклика. Очевидно, что небольшие ячейки значительно проще конструировать, если в них будут использоваться твердые, а не жидкие (ртуть) электроды. Постоянная времени вольтамперометрической ячейки относительно велика ($>0,5$ с). Более того, для подавления высокочастотных шумов в электронную схему детектора необходимо вводить аналоговые фильтры. Это неизбежно приводит к дальнейшему увеличению постоянной времени детектора (до 5 с).

Для изготовления как рабочих электродов, так и электродов сравнения чаще всего используются металлы, платина и золото, материалы на основе углерода, стеклоуглерод, углеродная паста, графит.

Материал электрода оказывает решающее влияние на рабочий диапазон электрохимического детектора, поскольку имеет

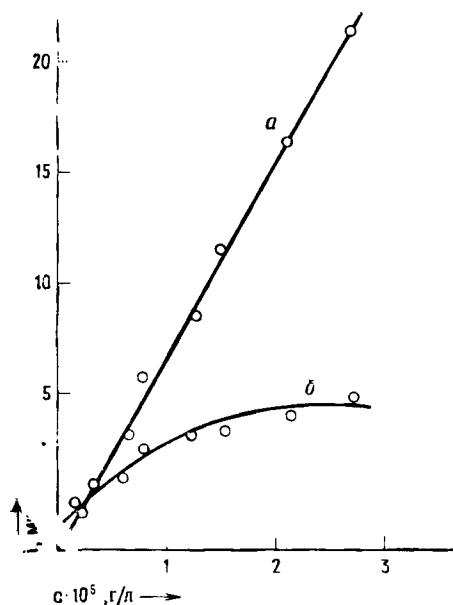


Рис. 3.28. Линейность сигнала двухэлектродного детектора (с разрешения Elsevier Scientific Publishers, Amsterdam) [47].

а — рабочий и вспомогательный электроды расположены друг напротив друга; *б* — вспомогательный электрод расположен после рабочего.

свое собственное значение перенапряжения, выше которого происходит пробой окружающей жидкости (элюента). Поэтому диапазон потенциалов, в пределах которого может проводиться обнаружение исследуемых соединений, в значительной мере зависит от материала электрода. Для стеклоуглерода этот диапазон составляет примерно от $-1,0$ до $1,3$ В, для ртути от $-2,0$ до $0,3$ В. Эти цифры обретают смысл только при сопоставлении с потенциалом электрода сравнения, в данном случае насыщенного каломельного электрода (НКЭ). Наиболее распространены такие электроды сравнения, как $\text{Ag}|\text{AgCl}$ и $\text{Hg}|\text{HgCl}$ (НКЭ). Их характеристики (температурный коэффициент) хорошо изучены, и эти электроды легко миниатюризовать, что очень важно для применения в детекторах ВЭЖХ.

Малый объем ячейки не единственное условие нормальной работы преобразователя в качестве ячейки детектора. Первостепенное значение имеет взаимное расположение электродов — рабочего, сравнения и вспомогательного. В частности, весьма важно, как располагаются электроды, проводящие электрический сигнал, так как величина падения напряжения iR непосредственно зависит от расстояния между ними.

Слишком большая величина падения напряжения iR может весьма существенным образом повлиять на качество работы детектора, в частности на линейность сигнала (рис. 3.28), как это показали Лаклема и Поп [47] на примере описанных ими кулонометрических детекторов.

Таблица 3.3. Устройство ячеек амперометрических и кулонометрических детекторов

Тип детектора	Конструкция ячейки	Литература
Амперометрический	1) Тонкослойная ячейка, 3 электрода, 0,5 мкл	50
	2) Ячейка форсуночного типа, 3 электрода, 4 мкл	51
Кулонометрический	3) Цилиндрическая	52
	4) Планарная ячейка, 3 электрода, геометрический объем 28 мкл, время отклика 0,6 с	47
	5) Пористый диск	53

Детекторы с ячейкой такой конструкции изготавливаются рядом фирм.

Идея использования ртути в качестве материала электрода при изготовлении электрохимических детекторов для ВЭЖХ представляется очень заманчивой, поскольку для ртути характерен широкий катодный (восстановительный) диапазон. Однако практическое решение этой задачи затруднено из-за сложности создания преобразователя малого объема со свободно падающими каплями ртути. Одновременно приходится решать проблему компенсации гигантских емкостных токов, возникающих в результате различий в диаметрах ртутных капель, без увеличения постоянной времени детектора.

Очень красивое решение этой проблемы было найдено Фреем и Ханекампом [54] (рис. 3.29). Эти авторы выбрали горизонтальный капилляр для подачи ртути потому, что он обеспечивает очень малые времена падения капли (мс), что надежно снижает уровень емкостных токов. Как следствие очень малого размера капель объем отклика, т. е. объем, в котором происходит обнаружение, также очень мал (< 10 мкл).

Дрейф и шумы. Весьма важная проблема электрохимического обнаружения в ВЭЖХ — это регистрация небольших изменений тока, обусловленных изменениями концентрации элюируемых соединений, на фоне значительно больших (в 10—1000 раз) постоянных фоновых токов. Этим и объясняется наличие очень широкого диапазона «подстроечного» регулятора у электрохимических детекторов, необходимого для «снулирования» сигнала. Однако поскольку «снулирование» сигнала не означает устранения высокого фона, то у детекторов этого типа ярко выражены все связанные с наличием последнего недостатки в работе, такие, как дрейф, блуждание, шумы.

Поскольку в основе появления высокого фонового сигнала лежат электрохимические процессы, дрейф и блуждание сильно зависят от внешних факторов (температуры, влажности),

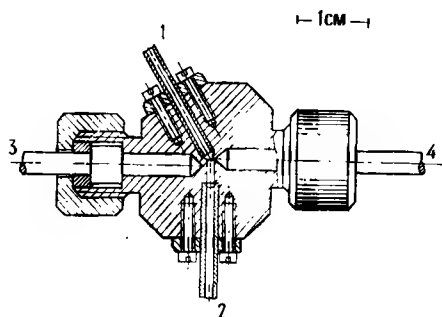


Рис. 3.29. Полярографический детектор конструкции Фрея и Ханекампа [54].

1 — вход; 2 — выход (вспомогательный электрод); 3 — электрод сравнения; 4 — ртутный капающий электрод.

и конструкция отсека ячейки в корпусе детектора должна быть такой, чтобы воздействие внешних факторов было полностью исключено. По мнению автора, в большинстве выпускаемых промышленным способом приборов эта задача решена неудовлетворительно.

Кроме того, следует четко представлять себе, что величина сигнала, который надо обрабатывать, лежит в пикоамперном диапазоне. Поэтому отсек ячейки (цилиндр Фарадея) и подходящие к нему извне проводники должны быть тщательно заизолированы. Одновременно требуется специальная конструкция источника питания и сети проводов, позволяющая избежать скачков частоты.

Внутренние шумы детектора имеют электрохимическую и электрическую природу. Шумы напряжения, создаваемые потенциостатом и электродом сравнения, вызывают поляризационные эффекты на поверхности рабочего электрода, что в свою очередь создает шумы тока, преобразуемые в шумы напряжения выходного сигнала. Таким образом, площадь поверхности рабочего электрода оказывает большое влияние на шумы детектора [49].

Первостепенное значение имеют тщательность разработки и качество электрических компонентов детектора.

Однако шумы, возникающие вследствие электрохимических процессов, например окисление/восстановление электрохимически активных примесей в подвижной фазе, очень часто оказываются значительно выше, чем электрические шумы, особенно на крайних участках диапазона напряжений ячейки. В частности, при работе в восстановительном режиме в результате присутствия ионов металлов, выщелачивающихся из стальных капилляров, и растворенного кислорода могут возникать высокие фоновые токи, и как следствие пропорционально будут увеличиваться и шумы.

Чтобы избежать этого, Фрей и сотр. [55] предложил использовать электрохимический скруббер для подвижной фазы.

Этот скруббер представляет собой электрохимическую ячейку большой емкости, встроенную в линию подачи растворителя между насосом и местом ввода пробы. Потенциал ячейки устанавливается таким образом, что все мешающие соединения окисляются/восстанавливаются до момента ввода пробы.

Разработки. В процессе развития электроаналитической химии, ставшей уже традиционным разделом аналитической химии, были введены многочисленные усовершенствования в ранее разработанные методы. Применение пульсирующего напряжения, формирование дифференциальных сигналов, использование сканирующего режима сделали вольтамперометрию мощным аналитическим методом. Внедрение этих технических приемов расширяет возможности электрохимического метода обнаружения в ВЭЖХ.

Авторы главы считают, что данная методика получит распространение в ближайшие годы. Трудоемкость применения детекторов рассматриваемого типа при этом снизится лишь незначительно, однако указанные разработки могут, по-видимому, привести к созданию электрохимических детекторов, которые можно будет легко использовать в качестве рутинных мониторов, столь же «неприхотливых», как УФ-детекторы, и столь же селективных и чувствительных, как электрохимические детекторы.

Как уже упоминалось ранее, чтобы какое-либо соединение можно было обнаруживать вольтамперометрически, в нем должен содержаться так называемый электрофор — это основное требование. Кроме того, потенциал, при котором протекает электрохимическая реакция, должен лежать в пределах, определяемых конструкционным материалом электродов ячейки. По этим причинам число классов соединений, которые можно обнаруживать рассматриваемыми методами, ограничено.

Более того, поскольку принципы обнаружения требуют наличия проводящих жидкостей, это в свою очередь ограничивает диапазон применимости таких хроматографических методов, в которых используются водные или буферные подвижные фазы.

В табл. 3.4 приведен список наиболее важных классов соединений и указан соответствующий им диапазон потенциалов окисления/восстановления. Подробные литературные источники, касающиеся конкретных областей применения, имеются у большинства фирм, выпускающих такие приборы (Bioanalytical Systems, Methrom).

Следует сделать одно общее замечание, касающееся применения данного метода обнаружения. Хотя возможности метода ограничены, амперометрические и кулонометрические детекторы предпочтительны во всех тех случаях, когда приходится работать с классом соединений, способных к электрохими-

Таблица 3.4. Список электроактивных соединений, анализируемых методом ВЭЖХ с обнаружением электрохимическими методами

Анализируемое соединение	Потенциал, В				
	-2	-1	0	+1	+2
Фенолы					
Катехины/дегидроксииндолы					
Ароматические амнины					
Меркаптаны/сульфиды					
Пурины					
Фенотиазины				...	
Нитропроизводные					
Нитрозопроизводные					
Хиноны					
Имины, семикарбазиды					

ческим превращениям. Это объясняется высокой селективностью электрохимических детекторов, их чувствительностью и низким пределом обнаружения.

3.6.6. Обнаружение с использованием химических реакций

3.6.6.1. Введение. Как было показано в предыдущих разделах, обнаружение компонентов элюируемой пробы возможно только в том случае, если компоненты обладают какими-либо свойствами, позволяющими отличить их от подвижной фазы, или если в результате их присутствия свойства подвижной фазы меняются. Однако эти требования значительно ограничивают возможности обнаружения растворенных веществ. Неспецифические детекторы, например рефрактометрические, имеют ограниченную обнаруживающую способность, в то время как специфические детекторы реагируют на растворенные соединения только в том случае, если последние содержат хромофор или электрофор.

Таким образом, обнаружение малых концентраций соединений, не обладающих ни хромофорными, ни электрофорными свойствами, представляет собой сложную задачу.

Обнаружение поглощающих свет соединений также оказывается трудным при анализе проб сложного состава, например проб, получаемых при биологических или медицинских исследованиях. В этом случае необходима высокая селективность обнаружения.

Таблица 3.5. Основные особенности пред- и послеколоночной модификации

	Предколоночная модификация	Послеколоночная модификация
Условия реакции	Можно подобрать оптимальные условия проведения химической реакции Время реакции не ограничено	Реагенты и реакции должны быть совместимы с подвижной фазой Время реакции определяется достигнутым разделением
Производные	Степень превращения должна составлять 100% Хроматографическое разделение затруднено, так как производные «более» идентичны Возможно образование диастереоизомеров. Будут элюироваться отдельными пиками. Возможно появление ложных пиков Простота процедуры	Степень превращения должна быть воспроизводимой Хроматографическое разделение не нарушается модификацией Ложные пики и пики изомеров перекрываются Трудно проводить рутинные анализы

В свете сказанного обнаружение с использованием химических реакций предоставляет широкие возможности. Основу этого метода составляет введение хромофорных или электрофорных групп путем химической реакции (модификация). Разумеется, такую модификацию можно выполнить и до проведения хроматографического разделения, т. е. можно провести «предколоночную модификацию». При проведении послеколоночной модификации элюат смешивается с реагентом в потоке, и растворенные соединения образуют поглощающие свет или флуоресцентные производные. Если это необходимо, потоки реагента и подвижной фазы интенсивно перемешиваются, нагреваются и (или) задерживаются в промежуточном объеме для полного завершения медленных реакций.

Непосредственно после окончания реакции реакционная смесь поступает в детектор, чаще всего флуориметрический.

Сравнение пред- и послеколоночной модификации (табл. 3.5) показывает преимущества и недостатки обоих методов. Выбор того или иного метода будет зависеть от конкретных условий.

3.6.6.2. Общие положения. После выхода из колонки (с) анализируемое соединение (*j*) содержится в объеме (*V*), характеризующемся дисперсией ($\sigma^2_{V,j(c)}$):

$$\sigma^2_{V,j(c)} = V^2_{R,j}/n$$

где $V_{R,j}$ — удерживаемый объем, соединения *j*, а *n* — число

теоретических тарелок в колонке. В данном случае вклад всех остальных компонентов системы (за исключением реактора), влияющих на размывание полос, в значении дисперсии объема не учитывается.

Если выходящий из колонки элюат смешивается с потоком реагента (г), дисперсия полосы соединения возрастает согласно выражению

$$\sigma^2_{V,j(c+r)} = ((F_c + F_r)/F_c)^2 \sigma^2_{V,j(c)} = F_s^2 \sigma_{V,j(c)}$$

где F_c — скорость потока через колонку и F_r — объемная скорость подвижной фазы в колонке, F_r — объемная скорость реагента, F_s — отношение объемных скоростей.

Реактор также будет вносить вклад в размывание полосы. Этот вклад характеризуется дисперсией $\sigma^2_{V,R}$. Таким образом, суммарное размывание полосы после проведения реакции составит

$$\sigma^2_{V,j(c+r+R)} = F_s^2 \sigma^2_{V,j(c)} + \sigma^2_{V,R}$$

Максимально достижимое хроматографическое разрешение определяется выражением

$$R^{\max} = \Delta V_{Rji} / 4\sigma_{V,j(c)}$$

В этом уравнении ΔV_{Rji} — разность удерживаемых объемов двух последовательно элюирующихся пиков i и j . После смешения с потоком реагента и проведения реакции в реакторе эта разность станет равной $F_s \Delta V_{Rji}$.

Таким образом, после проведения химической реакции разрешение составит

$$R = F_s \Delta V_{Rji} / 4\sigma_{V,j(c+r+R)}$$

Объединяя два последних уравнения, получаем

$$R = \left(1 + \frac{1}{F_s^2} \frac{\sigma^2_{V,R}}{\sigma^2_{V,j(c)}} \right)^{-\frac{1}{2}} R^{\max}$$

Поскольку величина $\sigma_{V,j(c)}$ характеризует колонку, потеря разрешения вследствие размывания полосы в реакторе определяется отношением объемных скоростей F_s и значением $\sigma_{V,R}$, характеризующим выбранный тип реактора. Если величина максимально допустимой потери разрешения определена, то, зная ширину полосы на хроматограмме, можно рассчитать предельно допустимое размывание полосы в реакторе.

Например, предположим, что отношение $R/R^{\max} = 0,8$, т. е. допускается 20%-ная потеря разрешения, создаваемая реактором, следовательно,

$$\sigma_{V,R} \leq 0,75 \sigma_{V,j(c)} F_s$$

или в единицах времени

$$\sigma_{t,R} \leq 0,75 \sigma_{t,j(c)}$$

Эти требования могут стать очень жесткими при уменьшении объема колонки.

3.6.6.3. Типы реакторов. При разработке послеколоночных реакторов необходимо руководствоваться следующими соображениями: время пребывания в реакторе должно соответствовать времени, необходимому для проведения реакции, и дисперсия, обусловленная пребыванием в реакторе, должна быть минимальной. Очевидно, что размывание полосы в реакторе возрастает с увеличением времени реакции.

Кроме того, следует четко представлять, что, хотя размывание полос в продольном направлении (направлении потока) должно быть ограничено, необходимо тщательное перемешивание в радиальном (поперечном) направлении после смешения реагента и элюата, с тем чтобы все анализируемые молекулы были «замечены» молекулами реагента. Эту до некоторой степени противоречивую задачу можно решить несколькими путями.

Реакторы с насадкой. Расчет и конструирование реакторов этого типа описаны в работах [56, 57]. Чаще всего реакторы с насадкой изготавливаются на основе стандартных колонок для ЖХ, заполненных инертными несжимающимися частицами размером от 5 до 35 мкм. Дисперсия по длине колонки в таких реакторах контролируется выбором частиц соответствующего размера. Время реакции можно менять, меняя длину реактора.

Для выбора оптимальных условий весьма полезна показанная на рис. 3.30 номограмма. Исходя из требуемого времени реакции t_r и допустимой ширины полосы σ_t , по ней можно определить размер частиц и перепад давления в колонке реактора. Диаметр реактора можно рассчитать, исходя из времени реакции и перепада давления на колонке.

Реакторы с насадкой следует выбирать в тех случаях, когда требования к размыванию полос оказываются очень жесткими (очень небольшое размывание в реакторе). К сожалению, в реакторе, наполненном маленькими частицами, перемешивание в радиальном направлении очень слабое [58], и поэтому необходимо дополнительное смесительное устройство.

В литературе описано несколько несложных Т-образных дополнительных устройств [56, 59, 60]. Опыт авторов главы показывает, что очень практична и эффективна смесительная колонка малого объема (например, 100×1 мм), наполненная частицами крупного размера (100 мкм).

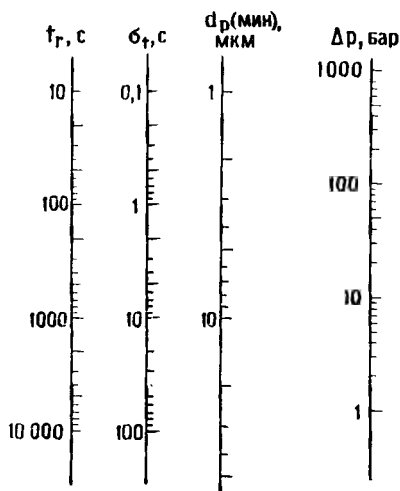


Рис. 3.30. Номограмма, представляющая графическую зависимость между техническими характеристиками проточного реактора с насадкой [56].

Трубчатые реакторы. Процесс протекания жидкости через прямые трубки (капилляры) и связанное с этим размывание полос в хроматографических системах подробно описаны в литературе [61—64]. Результаты этих работ, а также работ [56, 57] показывают, что капилляры непригодны в качестве реакторов, если уровень размывания полос в них не будет искусственно снижен по сравнению со значениями, предсказываемыми теорией для прямых капилляров. Такое снижение достигается путем использования так называемого «эффекта вторичного потока».

Под «первичным» потоком подразумевается поток (направление), задаваемый внешней силой (насосом). «Вторичный» поток создается центробежными силами, которые действуют в направлении, перпендикулярном направлению первичного потока.

Поскольку из практических соображений капилляры обычно свернуты в спирали, очень важно помнить, что, меняя диаметр такой спирали, можно управлять степенью размывания полос в трубчатом реакторе. На рис. 3.31 показано влияние диаметра спирали на ширину зоны в трубчатом реакторе.

Количественные соотношения между величиной эффекта вторичного потока и диаметром спирали приведены в работах [57, 62]. Этот эффект становится заметным при соотношениях диаметр спирали/диаметр трубки, меньших 25—50.

Для уменьшения размывания полос в трубчатых реакторах предложены также сжатые капилляры [63].

Очень изящный путь использования вторичного потока в трубке описан в работе [60]. Предложенный ее авторами ре-

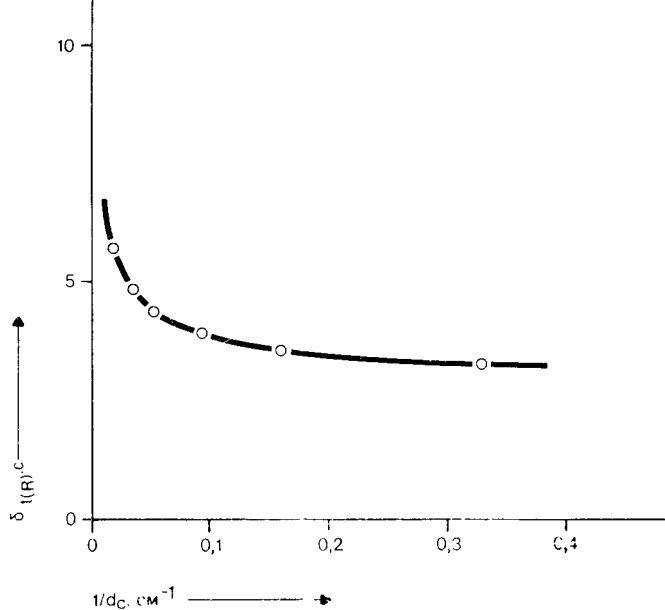


Рис. 3.31. Влияние диаметра петли, в которую свернута трубка, на эффект размывания полос [57].

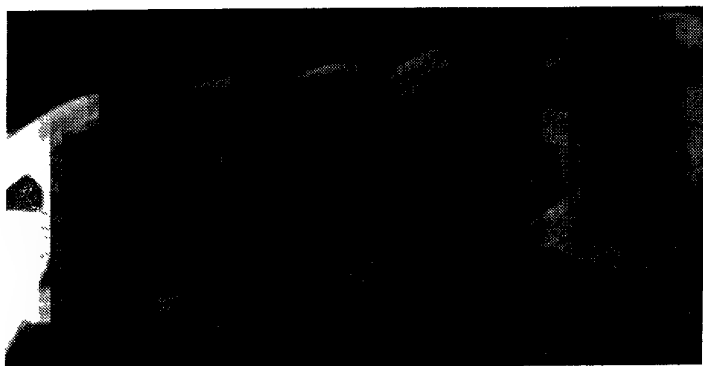


Рис. 3.32. Плетеный трубчатый реактор (с разрешения Prof. Dr. H. Engelhardt) [60].



Рис. 3.33. Разделение потока при помощи пузырьков воздуха.

актор имеет вид компактного шнура (рис. 3.32), сплетенного из гибкой тефлоновой трубки. Этот реактор отличается примечательно малой зависимостью величины размывания полос от объемной скорости по сравнению с рассчитанными для потока в прямых трубках.

Эффект вторичного потока создает также хорошее радиальное перемешивание. Это означает, что при наличии вторичного потока можно отказаться от внешних смесительных устройств.

Реакторы с делением потока. Эти реакторы также относятся к типу трубчатых. Они используются в хорошо известных проточных автоанализаторах (Technicon) для химического обнаружения разделенных соединений. В реакторах этого типа поступающая реакционная смесь делится на небольшие порции путем регулярного добавления в поток некоторого количества несмешивающейся фазы (жидкости или газа, чаще всего воздуха) (рис. 3.33).

Теоретические основы процесса размывания полос в реакторах этого типа разработаны Снайдером [65] и Дилдером [66].

Реакторы с делением потока нашли широкое применение в послекOLONОННЫХ реакторных детекторах. Тем не менее их трудно приспособить к требованиям, предъявляемым ВЭЖХ, хотя некоторый прогресс в этом направлении все же достигнут [67]. Особенности конструкции реактора делают его пригодным только для использования в области умеренных температур, в результате чего время проведения реакции обычно достаточно велико.

3.6.6.4. Выбор реактора; реакционные системы обнаружения. В разд. 3.6.6.2. обсуждался вопрос о том, что выбор реактора должен определяться качеством разделения, достигаемым на колонке. Следовательно, окончательный выбор типа реактора проводится самим исследователем. Тем не менее хотелось бы привести несколько общих рекомендаций. Если размывание полос в реакторе должно быть минимальным, следует остановиться на реакторе с наполнителем. Реакторы в виде изогнутых в спираль, сжатых или сплетенных трубок удобны тем, что необходимые для их изготовления компоненты легкодоступны.

Кроме того, реакторы этого типа забиваются реже, чем реакторы с насадкой. Тем не менее, несмотря на эффект вторичного потока, размывание полос в таких реакторах более значительно, что и ограничивает их применение.

Реакторы с разделенным потоком следует выбирать в тех случаях, если используемая реакция проходит достаточно медленно. К их преимуществам относится коммерческая доступность всех компонентов системы. Отсекатели пузырьков, сепараторы фаз, реакционные петли, насосы для реагентов и соединения используются также в анализаторах непрерывного действия.

В настоящее время в продажу поступает весьма ограниченное число компонентов систем трубчатых реакторов с насадкой для послеклоночного обнаружения с использованием химических реакций, и основные компоненты такой установки (реактор, термостатированная камера, насосы для реагентов — насосы низкого давления с точным объемом подачи жидкости, Т-образные соединения, смесительные устройства и регуляторы обратного давления) исследователь должен компоновать самостоятельно.

3.6.6.5. Рекомендации по применению. Широкое распространение метода обнаружения с послеклоночной модификацией элюируемых веществ — наглядный пример его необычайной гибкости. Этой теме посвящены два отличных обзора [68, 69], в которых во всех деталях рассмотрены наиболее важные области применения метода.

Анализ областей применения метода не входит в задачи этой книги, тем не менее следует подчеркнуть, что приложений метода обнаружения с применением химических реакций в принципе может быть столько же, сколько существует качественных реакций в органическом анализе [70, 71]. Главная задача обнаружения в органическом анализе такая же, что и в ВЭЖХ: отличить интересующие исследователя соединения от других соединений, входящих в исследуемую смесь. Таким образом, все бесчисленное множество реакций, разработанных для анализа органических соединений, в принципе пригодно для обнаружения с применением химических реакций.

3.7. Препаративное разделение

3.7.1. Введение

Как уже упоминалось во введении к этой книге, жидкостная хроматография возникла и длительное время использовалась как препаративный метод. С начала 60-х годов с появлением таких детекторов, которые можно подключать к разделитель-

ной колонке, этот метод начал применяться и в аналитических целях.

На одной из последних выставок-продаж хроматографического оборудования специалистам по аналитической химии был задан вопрос: «Если вы проводите препаративное разделение методом ЖХ, какое количество чистого вещества вы хотите получить?» Результаты этого опроса представлены на рис. 3.34 в виде зависимости числа ответов (в процентах) от количества образца, которое необходимо выделить. Согласно этим данным, для 40% опрошенных количество менее 100 мг представляется приемлемым. Большинство аналитиков считают, что это количество должно составлять порядка нескольких сотен микрограмм. Как препаративный метод хроматография имеет по сравнению с другими методами значительные преимущества, заключающиеся в высокой селективности и эффективности, что позволяет разделять даже самые сложные смеси за сравнительно короткое время. По этим причинам данный метод весьма предпочтителен в тех случаях, когда необходимо получить чистые вещества в количествах, соответствующих указанному на рис. 3.34 диапазону.

К недостаткам хроматографии как препаративного метода следует отнести тот факт, что степень загрузки хроматографических колонок очень ограничена. В зависимости от растворимости молекул пробы в подвижной фазе и параметров изотермы распределения количество вещества, которое можно нанести на колонку, колеблется от 0,01 до 10 мг/г неподвижной фазы. Если это значение превышено, наблюдается резкое снижение эффективности колонки, выражающееся в увеличении высоты, эквивалентной теоретической тарелке. Характер этой зависимости показан на рис. 3.35. Этот эффект можно компенсировать, либо увеличивая размеры колонки [72], либо нанося пробу в виде последовательных малых порций до тех пор, пока не будет получено желаемое количество чистого вещества [73].

Масштабирование колонок для жидкостной хроматографии в отличие от масштабирования колонок для газовой хроматографии можно выполнить без потери эффективности разделения.

3.7.2. Области применения и условия разделения

В процессе практического развития препаративной жидкостной хроматографии, которое проходило с учетом описываемого выше эффекта, был разработан ряд различных систем, каждая из которых характеризуется набором специфических условий, касающихся режима разделения образца и эффективности разделения. Продемонстрировать эту ситуацию можно графиком,

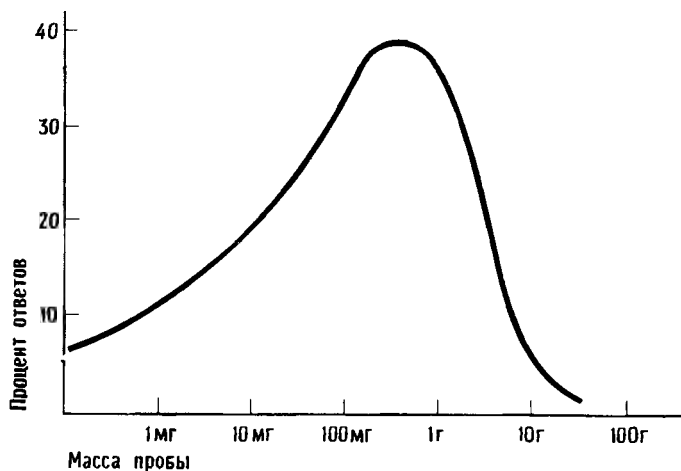


Рис. 3.34. Результаты опроса: процент исследователей, желающих разделить определенный объем пробы.

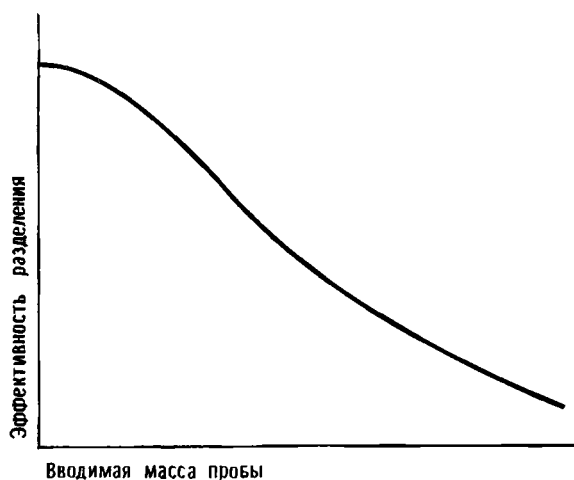


Рис. 3.35. Зависимость эффективности разделения от вводимого в колонку объема пробы.

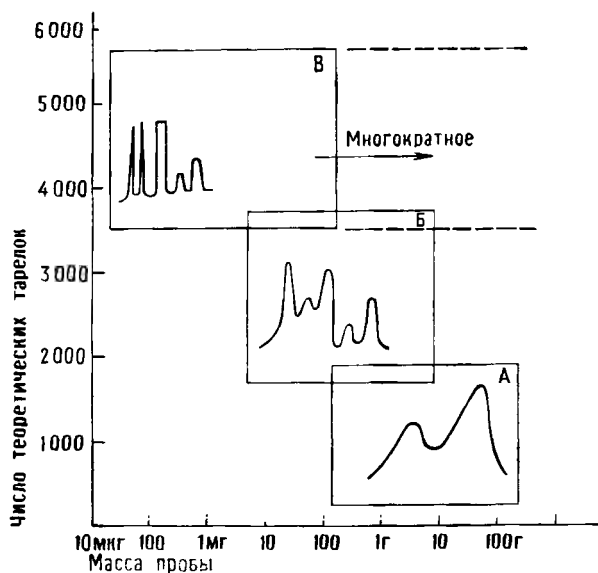


Рис. 3.36. Области применения preparативной жидкостной хроматографии.

напоминающим рис. 3.35. На рис. 3.36, который еще раз изображает зависимость эффективности разделения (показанную в виде хроматограмм) от количества нанесенного образца, можно выделить три следующие области. Область А — это область классической колоночной хроматографии. Процесс разделения в этом случае достаточно прост. Количество разделяемой пробы составляет от 100 мг до нескольких грамм. Разделение обычно проводят в одну стадию. Этот метод, как правило, используют для отделения целевого продукта от нежелательных побочных продуктов или для предварительного фракционирования групп соединений, например содержащихся в растительном экстракте. Разделение осуществляется на обычных стеклянных колонках внутренним диаметром от 2 до 10 см, заполненных сефадексом или силикагелем — неподвижная фаза. Подвижная фаза протекает через колонку под действием силы тяжести или же прокачивается насосом низкого давления. Система автоматического контроля отсутствует, элюат собирается без дополнительной проверки коллектором фракций, фракции в дальнейшем исследуются методами тонкослойной хроматографии, спектроскопии или визуально. Такие системы отличаются простотой конструкции и дешевизной, обслуживать их несложно. Однако их разрешающая способность ограничена.

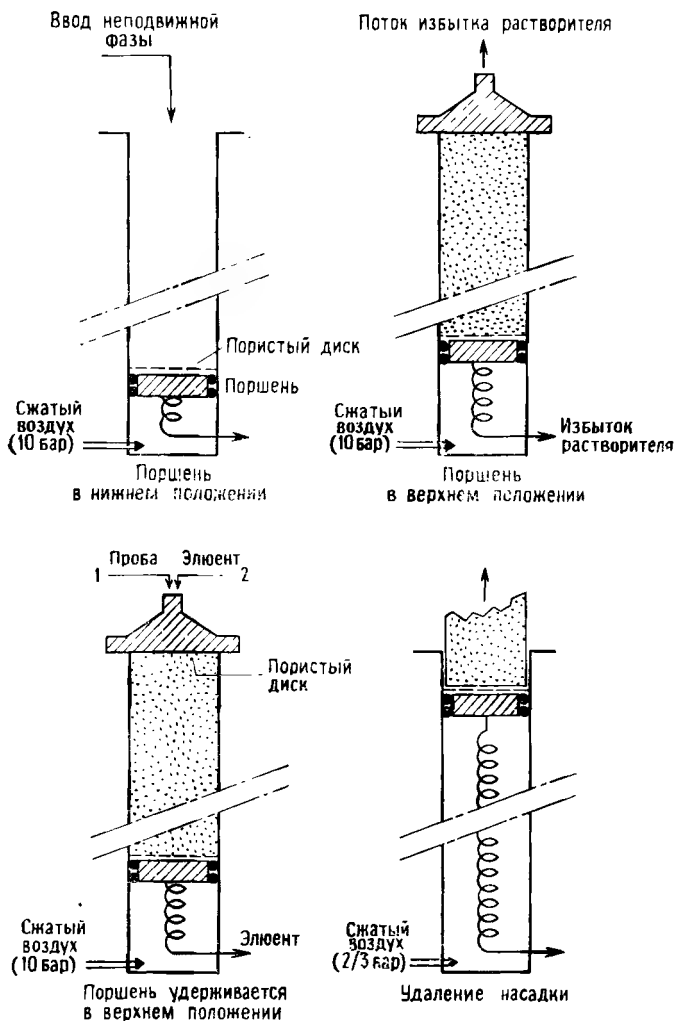


Рис. 3.37. Система Chromatospac Prep 100 (с разрешения Jobin Yvon Co.).

Интересный подход к проблеме увеличения разрешающей способности колонок этого типа предложен фирмой Jobin Yvon Co. в разработанной ею системе Chromatospac Prep 100 [74]. Как показано на рис. 3.37, внизу колонки помещен поршень, который может передвигаться вверх под действием сжатого воздуха. Неподвижную фазу загружают в колонку в виде суспензии, когда поршень находится в нижнем положении. После этого колонку сверху закрывают, перемещающийся вверх поршень сжимает носитель, удаляя избыток растворителя. Далее

на колонку наносят пробу и проводят разделение. Помимо более плотной и однородной упаковки колонки такая система имеет еще одно преимущество. Разделенные фракции не обязательно полностью элюировать из колонки. Как только первая фракция начинает элюироваться из колонки, элюирование прекращают, верхний ограничитель удаляют и выталкивают носитель из колонки. Содержащиеся в носителе фракции легко обнаружить при помощи УФ-лампы. После чего те из них, которые представляют интерес, можно отделить и экстрагировать. Эта методика, напоминающая методику хроматографического разделения, примененную М. С. Цветом, экономит растворитель и время, необходимое для проведения эксперимента. В таких системах обычно используют колонки размером 10×100 см, объемная скорость составляет от 20 до 100 мл/мин, а масса пробы — от 1 до 100 г на одно нанесение.

Область *Б* на рис. 3.36 представляет собой область получения особо чистых соединений, например для последующего синтеза или биологических испытаний. В этом случае необходима неподвижная фаза с более высокой разрешающей способностью и меньшим размером частиц, что соответствует промежуточной области между обычной и высокоэффективной жидкостной хроматографией. Размеры колонок ограничивает высокая стоимость неподвижной фазы и растворителей. Типичные параметры: колонка $50 \times 2,5$ см, объемная скорость от 50 до 250 мл/мин, масса пробы 50 мг на один цикл. Такие системы, выпускаемые промышленно, в ряде случаев снабжаются автоматическим устройством повторного ввода пробы, системой непрерывного контроля элюата и коллектором фракций.

Примером прибора, работающего в этом диапазоне, может служить Waters Prep LC/System 500, схема потоков растворителя в котором показана на рис. 3.38. Неподвижная фаза содержится в предварительно заполненных полиэтиленовых патронах, которые помещаются в специальную камеру и сжимаются в радиальном направлении давлением, создаваемым подвижной фазой, с целью получения колонки с более плотной и однородной структурой носителя. Рефрактометр служит монитором, обеспечивающим обнаружение всех элюируемых соединений.

Область *В* — это область полупрепаративной жидкостной хроматографии, в которой аналитические методы разделения масштабированы таким образом, что аналитические приборы используются для препаративных разделений; полностью реализуются разделительные возможности аналитической колонки; метод применяется для получения требуемых количеств вещества соответствующей чистоты для проведения идентификации вещества всеми возможными способами и установления его структуры. Физико-химические методы анализа и необхо-

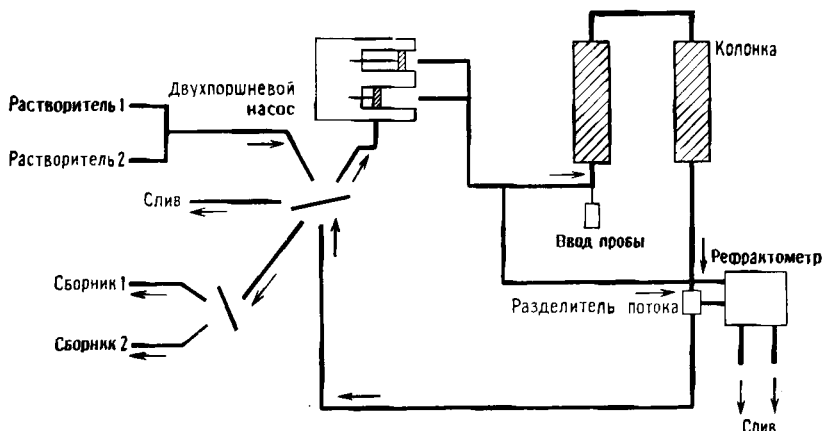


Рис. 3.38. Диаграмма потоков растворителя в хроматографе Waters Prep LC/System 500 (с разрешения Waters Ass. Co.).

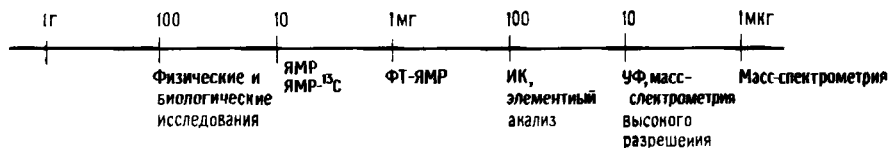


Рис. 3.39. Размеры проб, необходимые для идентификации соединений.

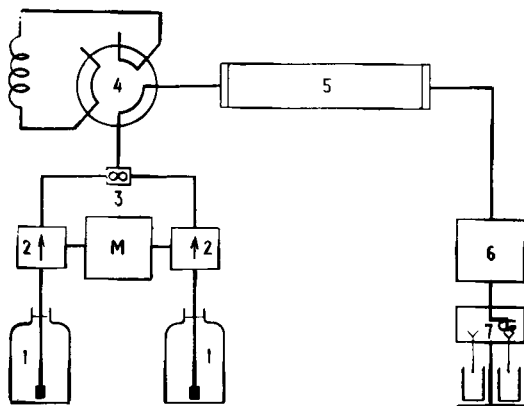


Рис. 3.40. Схема потоков растворителя в аналитическом жидкостном хроматографе, оборудованном приспособлениями для проведения препаративного разделения (с разрешения Hewlett-Packard Company).

1 — резервуар для растворителя; 2 — насос; 3 — смешивательная камера; 4 — система ввода проб; 5 — колонка; 6 — детектор; 7 — коллектор фракций.

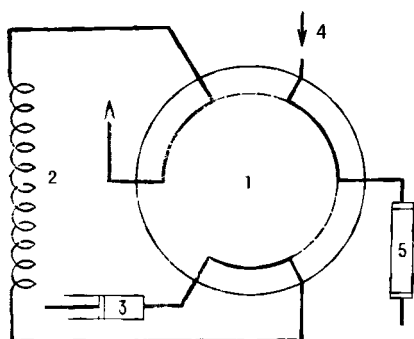


Рис. 3.41. Система ввода проб для препаративного разделения.

1 — 6-канальный кран; 2 — капилляр для образца; 3 — шприц для заполнения капилляра; 4 — подача растворителя от насоса; 5 — колонка.

димые для их проведения количества вещества указаны на рис. 3.39.

На рис. 3.40 показана схема потоков растворителя в Hewlett Packard 1084B Analytical High Pressure Liquid Chromatograph, к которому для выполнения препаративных разделений добавлены следующие узлы: препаративная система ввода пробы, препаративная колонка, коллектор фракций и система автоматического контроля ввода пробы и коллектора фракций.

Система ввода проб представляет собой 6-канальный кран, к которому подключен капилляр для хранения образца (рис. 3.41). В положении, изображенном на рисунке (сплошные линии), капилляр, объем которого может достигать 50 мл, можно заполнять при помощи шприца. В этом случае растворитель, подаваемый насосом, поступает непосредственно на колонку. Если кран переключен (штриховые линии), насос вытесняет соответствующий объем пробы на колонку. Время включения, которое может быть задано с клавиатуры контроллера прибора, и скорость подачи растворителя насосом определяют объем, вводимой в колонку пробы. При объемной скорости 5 мл/мин и времени включения 0,1 мин этот объем составит 500 мкл. Таким образом, капилляр для хранения образца объемом 25 мл позволит провести 50 последовательных вводов пробы.

На рис. 3.42 и 3.43 изображен коллектор фракций. Прошедший детектор элюат поступает в пространство, ограниченное цилиндрической стеклянной стенкой. Конец капилляра может поворачиваться на 360°. Круг разделен на 6 или 12 сегментов, которые либо подсоединены к сливным отводам, непосредственно ведущим в небольшие флаконы для сбора фракций, как показано на рис. 3.43, либо могут быть подключены к большим емкостям через соответствующие переходники.

Система ввода пробы и коллектор фракций контролируются микропроцессором прибора. Пример, приведенный на рис. 3.44, показывает, что программировать можно следующие

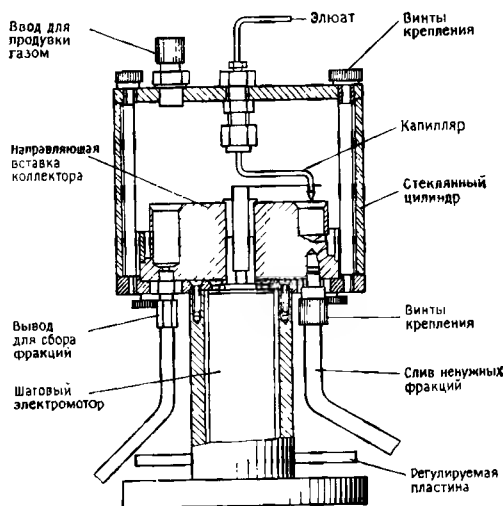


Рис. 3.42. Коллектор фракций (с разрешения Hewlett-Packard Company).

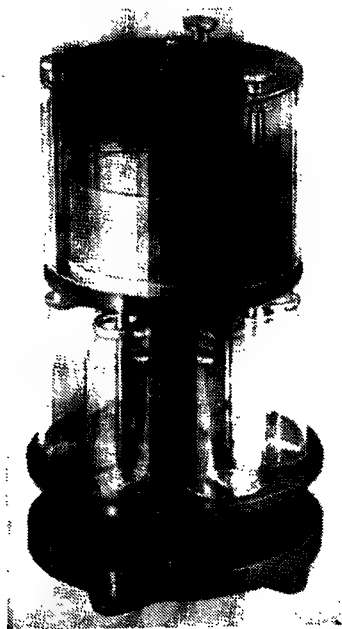


Рис. 3.43. Коллектор фракций (с разрешения Hewlett-Packard Company).

функции: продолжительность ввода пробы, число повторных вводов, объем вводимой пробы, моменты переключения коллектора фракций и длительность одного цикла разделения. На рис. 3.44 показано, каким образом временная программа препаративного разделения становится частью временной программы прибора, контролирующей и такие функции, как формирование градиента.

Прибор, подобный описанному, принимая во внимание допускаемую им возможность автоматически контролировать процесс разделения и осуществлять последовательный ввод проб, способен набирать очень чистые соединения в больших количествах. При достаточных количествах растворителя в резервуаре и пробы в капилляре такой прибор может работать всю ночь.

В общем случае выбор условий разделения зависит от конкретной задачи. Так, например, если имеется система фаз с высокой селективностью, то можно вводить большие количества пробы, требования к эффективности разделения (число теоретических тарелок колонки) невысоки, так что можно использо-

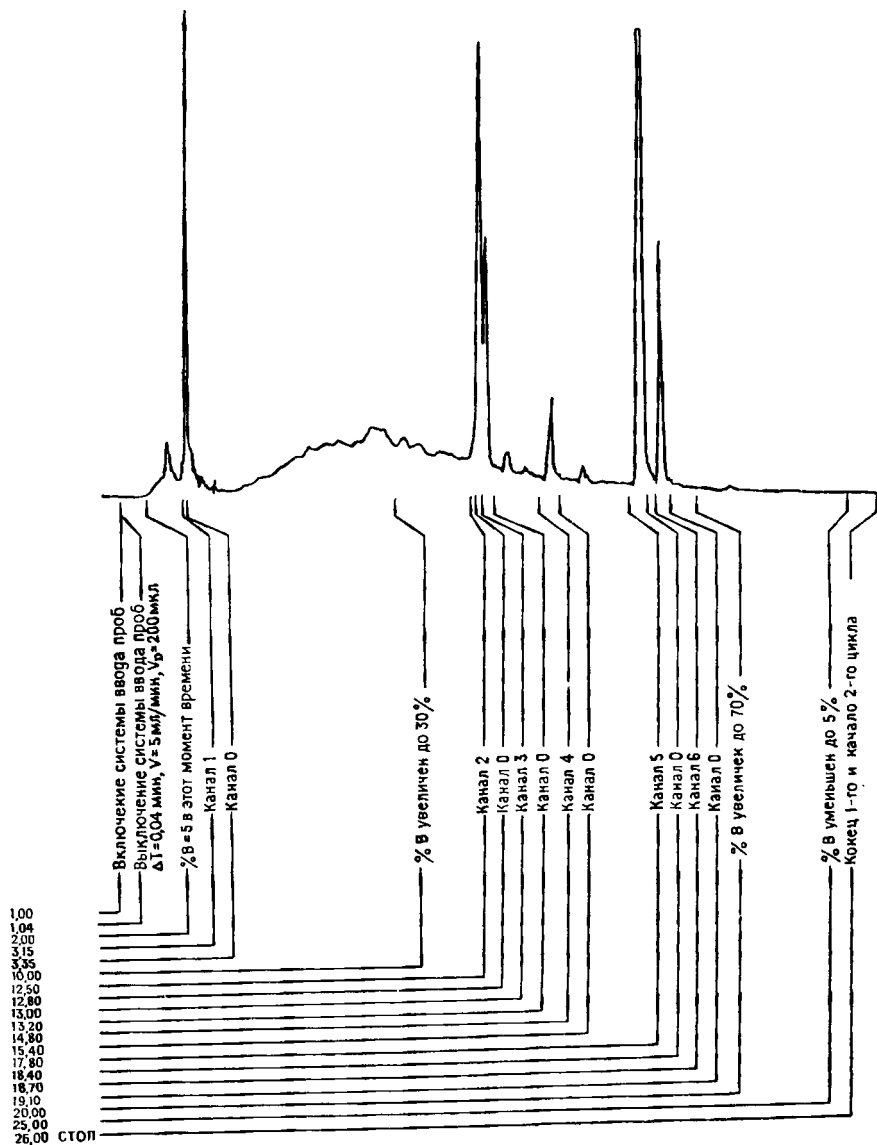


Рис. 3.44. Препаративное разделение.

Колонка: 250×8 мм с обращенной фазой C_8 ; объемная скорость: 5 мл/мин; объем пробы: 200 мкл; температура: комнатная; подвижная фаза: вода/ацетонитрил 5—70 об. % (градиентное элюирование). В таблице показан автоматический контроль ряда функций во времени.

вать колонки, заполненные крупными частицами. И наоборот, если разделение индивидуальных компонентов затруднено (малые значения α) и к чистоте получаемых соединений предъявляются высокие требования (необходимо высокое разрешение), разделение следует проводить на колонках, заполненных частицами малого диаметра. Иногда в таких случаях рекомендуется проводить разделение в две стадии: сначала на колонке с малой эффективностью, а затем на колонке с высокой эффективностью.

Литература

1. Handbook of Chemistry and Physics, 57th Ed., D108—D112. Chemical Rubber Co., Cleveland.
2. Daunderer Roth: Giftliste 2, Toxicologische Enzyklopaedie, ecomed.
3. Bakalyar S. R., Bradley M. P. T., Honganen R. J. Chromatogr., 158, 277 (1978).
4. Brown J. N., Hewins M., van der Linden J. H. M., Lynch R. J. Publ. No. 7042, 36,3877,11. Pye Unicam Cambridge.
5. Schrender H. CZ-Chemie-Technik, 1, 73 (1972).
6. Schrenker H. Am. Lab., March, 1978.
7. Schrenker H. Simulations of Effect of flow-rate instabilities in isocratic and gradient LC (not yet published).
8. Schoenmakers P. J., Billiet H. A. H., de Galan L. J. Chromatogr., 185, 179 (1979).
9. Snyder L. R., van der Wal S. Anal. Chem., 53, 877 (1981).
10. Schmid A. Chromatographia, 12, 825 (1979).
11. Loreny H. Chemie-Technik, 6, 233 (1977).
12. Plein G. Labor Praxis, 3, 112 (1979).
13. Product Bulletin "Compact Glas Columns", E. Merck, Darmstadt.
14. Techn. Bull. No. IM 182913 (1979). Waters Associates Inc.
15. Knox J. H., Laird G. R., Raven P. A. J. Chromatogr., 122, 129 (1976).
16. Golay M. J. E. J. Chromatogr., 240, 180 (1982).
17. Tweeten T. частное сообщение.
18. Sisco W. R., Gilpin R. K. J. Chromatogr. Sci., 18, 41 (1980).
19. Chmielowiec J., Sawatzky H. J. Chromatogr. Sci., 17, 245 (1979).
20. Gant J. R., Dolan J. W., Snyder L. R. J. Chromatogr., 185, 153 (1979).
21. Melander W. R., Nahum A., Horvath C. J. Chromatogr., 185, 129 (1979).
22. Herbut G., Kowalszuck J. S. J.H.R.C. and CC, 4, 27 (1981).
23. Melander W. R., Horvath C., in: C. Horvath (Ed.): High Performance Liquid Chromatography: Advances and Perspectives, vol. 2, p. 192, Academic Press, New York, 1980.
24. Perry J. (Ed.), in: Chemical Engineers Handbook, 4th Ed. McGraw Hill (1963).
25. Perdalski R. J., Wilder B. J. Anal. Chem., 51, 744 (1979).
26. Schrenker H. J. Chromatogr., 213, 243 (1981).
27. Kirkland J. J., Yau W. W., Stoklosa H. J., Dikls C. H. J. Chromatogr. Sci., 15, 303 (1977).
28. Colin H., Jaulmes A., Guiochon A., Corno J., Simon J. J. Chromatogr., Sci., 17, 485 (1979).
29. Rippahn J. Kontakte, 3, 28 (1978). Publication of E. Merck, Darmstadt.
30. Schrenker H. "Run Programming and Wavelength Programming Significantly improve HPLC Lab Efficiency", Hewlett-Packard Publication No. 5935—0025.
31. Dessy R. E., Reynolds W. D., Nunn W. G., Titus C. A., Moler G. F. J. Chromatogr., 126, 347 (1976).
32. Cline-Love L. J., Skrilec M. Int. Lab. (Apr. 1981), 50.

33. Gooyer L. "Sensitized room temperature phosphorescence", paper presented at the: Symposium on detection in HPLC Jan. 19—20, 1982 at the Free University of Amsterdam.
34. Todoriki H., Hirokawa A. Y. Chem. Pharm. Bull., **28**, 1337 (1980).
35. Malcolm-Lawes D. J., Warwick P., Gifford L. A. J. Chromatogr., **176**, 157 (1979) and J. Chromatogr., **200**, 47 (1980).
36. Jadamec J. R., Sauer W. A. Tolmi. Anal. Chem., **49**, 1316 (1977).
37. Hershberger L. W., Callis J. B., Christian G. D. Anal. Chem., **53**, 971 (1981).
38. Fogarty M. P., Shelly D. C., Warner I. M. J. HRC and CC, **11**, 561 (1981).
39. Haderka S. J. Chromatogr., **54**, 357 (1971); **57**, 181 (1971); **62**, 53 (1972).
40. Vespalec R. J. Chromatogr., **108**, 243 (1975).
41. Poppe H., Kuyslen J. J. Chromatogr., **132**, 369 (1977).
42. Schultz E. A., Mulhis D. E. Anal. Chem., **46**, 2253 (1976).
43. Deelder R. S., Linssen H. A. J., Koen J. G., Beeren A. J. B. J. Chromatogr., **203**, 153 (1981).
44. Loscombe C. R., Cox C. B., Dalziel J. W. J. Chromatogr., **166**, 403 (1978).
45. Small H., Stevens T. S., Bauman W. C. Anal. Chem., **47**, 1801 (1975).
46. Hanekamp H. B. Thesis 1981, Free University of Amsterdam; Hanekamp H. B., van Nieuwerkerk H. J. Anal. Chim. Acta, **121**, 13 (1980).
47. Lanklema J. Thesis 1976, Municipal University of Amsterdam; Lanklema J., Poppe H. J. Chromatogr., **125**, 375 (1976).
48. Bollet C., Oliva P., Caude M. J. Chromatogr., **149**, 625 (1977).
49. Van Rooyen H. W. Thesis 1981, Municipal University of Amsterdam.
50. Kissingner P. T., Refshauge C., Dreiling R., Adams R. N. Anal. Lett., **6**, 465 (1973).
51. Fleet B., Little C. J. J. Chromatogr. Sci., **12**, 747 (1973).
52. Armentrout D. N., McLean J. D., Long M. W. Anal. Chem., **51**, 1039 (1979).
53. Product Bulletin ESA Coulochem, Bedford, Massachusetts.
54. Hanekamp H. B., Voogt W. H., Bos P., Frei R. W. Anal. Lett., **12**, 175 (1979).
55. Hanekamp H. B., Voogt W. H., Bos P., Frei R. W. Anal. Chim. Acta, **118**, 81 (1980).
56. Huber J. F. K., Jonker K. M., Poppe H. Anal. Chem., **52**, 2 (1980).
57. van den Berg J. H. M. Thesis, 1979, Technical University of Eindhoven.
58. Knox H., Parcher J. F. Anal. Chem., **41**, 1599 (1969).
59. Frei R. W., Michel L., Santi W. J. Chromatogr., **126**, 261 (1977).
60. Engelhardt H., Neue U. D. Chromatographia, **15**, 403 (1982).
61. Taylor G. T. Proc. Roy. Soc. A, **219**, 186 (1958); Aris A. Proc. Roy. Soc. A, **235**, 67 (1956).
62. Tijssen R. Thesis 1979, Technical University of Delft.
63. Hofmann K., Halasz I. J. Chromatogr., **149**, 3 (1980).
64. Atwood J. G., Golay M. J. E. J. Chromatogr., **218**, 97 (1981).
65. Snyder L. R. J. Chromatogr., **125**, 287 (1976).
66. Deelder R. W., Hendricks P. H. J. J. Chromatogr., **83**, 343 (1973).
67. Scholten A. H. T. M., Brinkmann U. A. Th., Frei R. W. Anal. Chim. Acta, **114**, 137 (1980).
68. Lawrence J. F., Frei R. W. Chemical Derivatization in Liquid Chromatography Elsevier, Amsterdam, 1976.
69. Frei R. W., Lawrence J. F. Chemical Derivatization in Analytical Chromatography. Plenum Press, New York, 1981.
70. Knapp D. R. Handbook of Analytical Derivatization Reactions. Wiley, New York, 1979.
71. Zweig G., Sherna J. (Eds.) CRC and Book of Chromatography. Chemical Rubber Company.
72. Hupe K. P., Lauer H. H. J. Chromatogr., **203**, 41 (1981).
73. Hupe K. P., Lauer H. H., Zech K. Chromatogr., **12**, 1 (1980).
74. Publications No. Imprex 8337662 ISA Jobin Yvon.

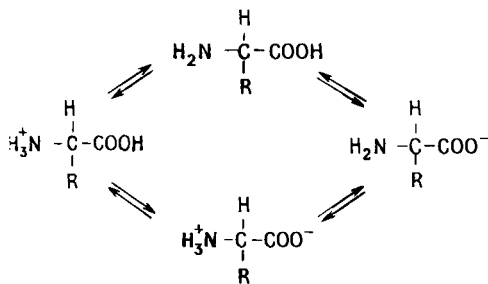
Аминокислоты, пептиды, белки

Ф. Лотспайх, А. Хеншен
(F. Lottspeich, A. Henschen)

4.1. Аминокислоты

4.1.1. Введение

Аминокислоты представляют собой небольшие амфотерные соединения с молекулярной массой от 75 до 200. В природе они присутствуют во множестве биологически важных соединений в виде свободных аминокислот, конъюгатов с другими соединениями и в виде конструктивных блоков, из которых состоят пептиды и белки. Общая структурная формула аминокислоты приведена ниже. Аминокислоты (за исключением пролина и его производных, см. далее) отличаются друг от друга только структурой боковой цепи R.



В биосинтезе природных пептидов и белков участвуют всего 20 аминокислот, коды которых определяются последовательностью нуклеотидов в генах. Строение этих аминокислот и некоторые их свойства приведены в табл. 4.1.

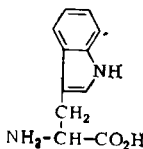
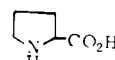
Однако известно большое число других аминокислот, не входящих в состав пептидов и белков [1]. Кроме того, в белках и пептидах обнаружены случаи пост-трансляционной модификации аминокислот [2]. Этот обзор посвящен в первую очередь 20 аминокислотам, входящим в состав пептидов и белков, а также их производным, часто встречающимся в работах по изучению химии белков.

При разделении аминокислот методом ВЭЖХ приходится сталкиваться с двумя основными проблемами. Одна из них обусловлена большим различием в полярности отдельных ами-

Таблица 4.1. Структуры стандартных аминокислот

Название	Структура	pK_a	pI
I. Алифатические аминокислоты			
Глицин (Gly)	$H_2N-CH_2-CO_2H$	2,34; 9,6	5,97
Аланин (Ala)	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,35; 9,69	6,02
Валин (Val)	$\begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ \diagdown \quad / \\ CH \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,32; 9,62	5,97
Лейцин (Leu)	$\begin{array}{c} CH_3 \quad CH_3 \\ \diagdown \quad / \\ CH \\ \\ CH_2 \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,36; 9,60	5,98
Изолейцин (Ile)	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH_2 \\ \\ CH-CH_3 \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,36; 9,68	6,02
II. Гидроксиаминокислоты			
Серин (Ser)	$\begin{array}{c} CH_2OH \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,21; 9,15	5,68
Треонин (Thr)	$\begin{array}{c} CH_3 \\ \\ CH-OH \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,63; 10,43	6,53
III. Дикарбоновые аминокислоты и соответствующие амиды			
Аспарагиновая кислота (Asp)	$\begin{array}{c} CO_2H \\ \\ CH_2 \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,09 (α -карбоксил); 3,86 (β -карбоксил); 9,82	2,87
Аспарагин (AspNH ₂) или (Asn)	$\begin{array}{c} CONH_2 \\ \\ CH_2 \\ \\ H_2N-CH-CO_2H \end{array}$	2,02; 8,8	5,41

Название	Структура	pK_a	pI
Глутаминовая кислота (Glu)	$ \begin{array}{c} \text{CO}_2\text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	2,19 (α -карбоксил); 4,25 (γ -карбоксил); 9,67	3,22
Глутамин (GluNH ₂) или (Gln)	$ \begin{array}{c} \text{CONH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	2,17; 9,13	5,65
IV. Аминокислоты, со- держащие основные функциональные группы Лизин (Lys)	$ \begin{array}{c} (\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	2,18; 8,95 (α -амино-); 10,53 (ϵ -амино-)	9,74
Гистидин (His)	$ \begin{array}{c} \text{HC}-\text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{HC}-\text{N} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \quad \text{H} \\ \\ \text{NH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	1,82; 6,0 (имидазол); 9,17	7,58
Аргинин (Arg)	$ \begin{array}{c} \text{I} \quad \text{NH} \\ \quad \\ (\text{CH}_2)_3-\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	2,17; 9,04 (α -амино-); 12,48 (гуанидино-)	10,76
V. Ароматические ами- нокислоты (гистидин включен в ка- тегорию IV)	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{NH} \\ \quad \\ (\text{CH}_2)_3-\text{N}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $		
Фенилаланин (Phe)	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	1,83; 9,13	5,98
Тирозин (Tyr)	$ \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2-\text{CH}-\text{CO}_2\text{H} \end{array} $	2,20; 9,11 (α -амино-) 10,07 (фенольный гидроксил)	5,65

Название	Структура	pK_a	pI
Триптофан (Trp)		2,38; 9,39	5,88
VI. Аминокислоты, содержащие серу Цистеин (Cys)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-SH} \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-CO}_2\text{H} \end{array}$	1,71; 8,33 (сульфгид- рильная группа); 10,78 (α -амино-)	5,02
Цистин	$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-S-} \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-CO}_2\text{H} \end{array} \right)_2$	1,65; 2,26 (карбоксилы); 7,85; 9,85 (аминогруппы)	5,06
Метионин (Met)	$\begin{array}{c} (\text{CH}_2)_2\text{-SCH}_3 \\ \\ \text{NH}_2\text{-CH-CO}_2\text{H} \end{array}$	2,28; 9,21	5,75
VII. Иминокислоты Пролин (Pro)		1,99; 10,60	6,10

нокислот, сложности возникают главным образом потому, что аминокислоты с заряженными боковыми цепями высокополярны. Другая проблема — следствие низких коэффициентов поглощения аминокислот в УФ-области. В принципе для обнаружения аминокислот можно использовать их поглощение в УФ-области при малых длинах волн, например при 200 нм, но малые коэффициенты поглощения карбоксильных групп вынуждают применять только сверхчистые растворители. Чтобы преодолеть эти трудности, приходится прибегать к пред- или постколониной модификации аминокислот. В первом случае можно получать гидрофобные производные аминокислот, которые значительно проще разделить методом ВЭЖХ. Кроме того, можно обрабатывать пробу модифицирующими реагентами, которые дают с аминокислотами производные со значительно более высокими коэффициентами поглощения. Постколониная модификация в качестве метода обнаружения аминокислот используется по схеме, аналогичной применяемой в

классическом аминокислотном анализаторе. К недостаткам метода послеколоночной модификации следует отнести необходимость в дополнительном, зачастую нестандартном оборудовании и еще большее уширение пиков.

4.1.2. Свободные аминокислоты

В последние 15 лет общепринятой методикой разделения свободных аминокислот была ионообменная хроматография, описанная Спакманом и др. [3], с применением послеколоночной модификации нингидрином, флуорескамином или фталевым альдегидом с целью последующего обнаружения. Относительно недавно было предпринято несколько попыток применить ВЭЖХ для аминокислотного анализа, и свободные аминокислоты удалось успешно разделить методами хроматографии на неподвижных фазах с химически привитыми функциональными группами, например обращенных фазах, аминофазах, а также методами ион-парной, лигандо- и ионообменной хроматографии.

4.1.2.1. Хроматография на химически связанных фазах. В фундаментальных исследованиях разделения аминокислот на неполярных неподвижных фазах [4] описано разделение неполярных аминокислот на обращенно-фазовых носителях в изократических условиях. В качестве элюента использовались водные буферные растворы с рН от 0,2 до 2,0, в которых карбоксильные группы аминокислот находятся в основном в недиссоциированном состоянии, что приводит к увеличению времени удерживания. Обнаружение проводилось при 200 нм. Как показали результаты исследований, логарифм коэффициента емкости линейно зависит от числа углеродных атомов в боковой цепи простых алкиламинокислот (рис. 4.1).

Вследствие высокой полярности гидрофильные аминокислоты весьма слабо удерживаются гидрофобными неподвижными фазами, тем не менее их разделение можно осуществить в результате введения в подвижную фазу ионогенных поверхностно-активных соединений, например децилсульфата. Это так называемая ион-парная хроматография, в процессе проведения которой гидрофобный, но заряженный ион-парный реагент ассоциируется с противоположно заряженной группой аминокислоты, что приводит к образованию ион-парного комплекса, имеющего более высокий коэффициент емкости, чем свободная аминокислота.

Другой пример ион-парной хроматографии аминокислот приведен в работе [5]. На рис. 4.2 показано разделение всех аминокислот белкового гидролизата, за исключением пары Glu/Gly.

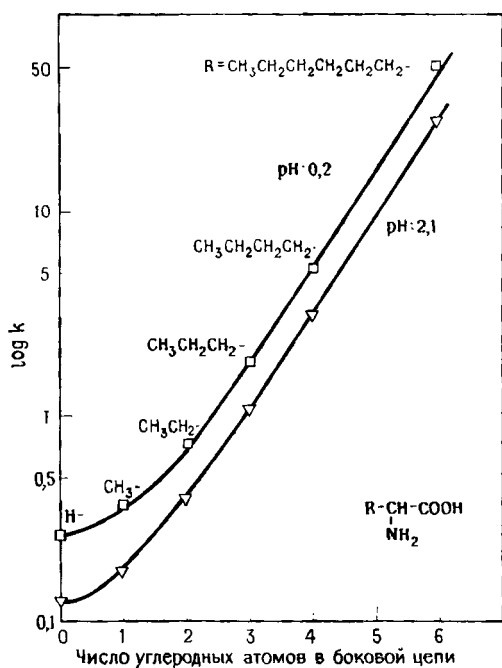


Рис. 4.1. График зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода в боковой цепи n -алкиламинокислот [4].

Неподвижная фаза: лихросорб RP-18, 5 мкм; элюент: 0,5 М хлорная кислота или 0,1 М фосфатный буфер, $\text{pH} = 2,1$; температура: 70 °C.

Предел обнаружения в 3 нмоль отдельной аминокислоты достигается в результате использования послекOLONочной обработки содержащихся в элюате аминокислот смесью фталевый альдегид/меркаптоэтанол, осуществляемой в потоке. Аппаратура, схема которой представлена на рис. 4.3, может служить примером дополнительного оборудования, необходимость в котором возникает в связи с послекOLONочной модификацией аминокислот.

Несколько иной подход к разделению гидрофильных аминокислот предусматривает применение более полярной неподвижной фазы. Автор работы [6] описал разделение свободных аминокислот на аминофазе: все аминокислоты, присутствующие в белковом гидролизате, были разделены таким способом всего за 30 мин. Элюирование велось в градиентном режиме смесью ацетонитрил/фосфатный буфер при температуре 35 °C, обнаружение проводилось при 200 нм. В описываемом примере перед экспериментаторами стояла задача — определить свободные аминокислоты в растворах для внутривенных вливаний и ряде других фармацевтических препаратов. Поглощающие в УФ-области примеси, содержащиеся в гидролизате белков, могут искажать интерпретацию хроматограммы, особенно вблизи предела обнаружения.

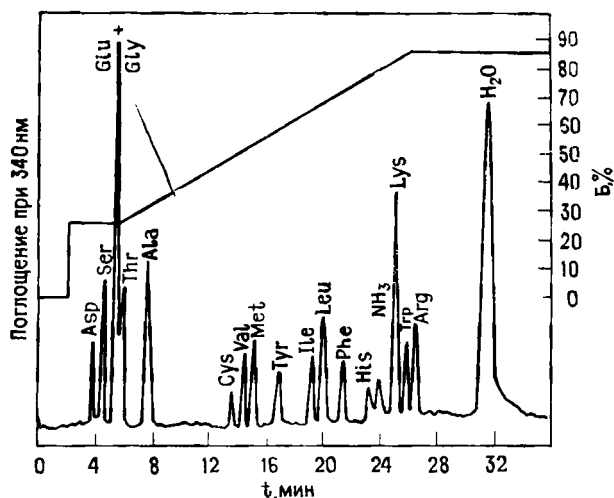


Рис. 4.2. Разделение стандартной смеси свободных аминокислот (3 нмоль) методом непарной хроматографии [5].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: А — рН 2,85, 0,07%-ный децилсульфат аммония/0,5%-ная уксусная кислота, Б — 0,12%-ный гептансульфонат/0,25%-ная уксусная кислота/20%-ный ацетонитрил/10%-ный метанол, элюирование в ступенчатом градиентном режиме; послеклоночная модификация: фталевый альдегид/2-меркаптоэтанол.

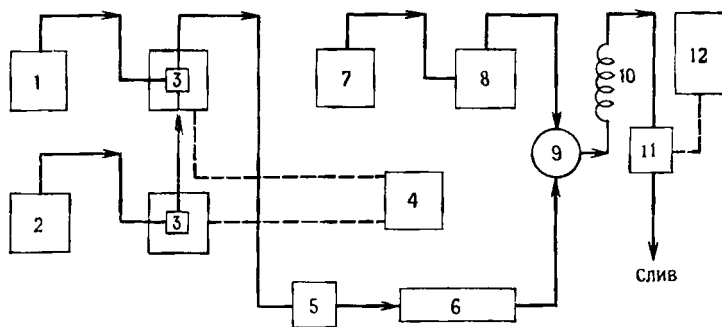


Рис. 4.3. Схематическая диаграмма оборудования для послеклоночной модификации [5].

1, 2 — резервуары для элюента; 3 — насос; 4 — программатор градиента; 5 — система ввода проб; 6 — колонка; 7 — резервуар с реагентом для синтеза производных; 8 — насос; 9 — Т-образный смеситель; 10 — трубчатый реактор; 11 — УФ-детектор; 12 — самописец.

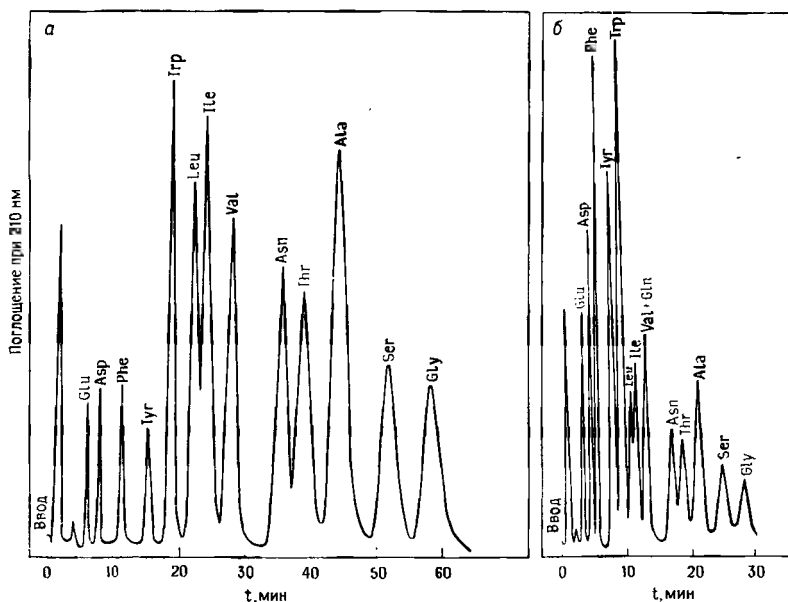


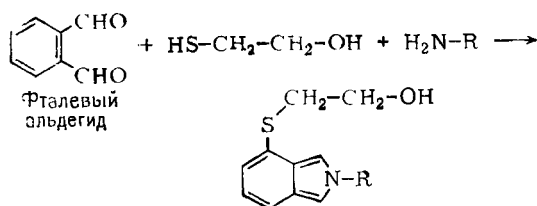
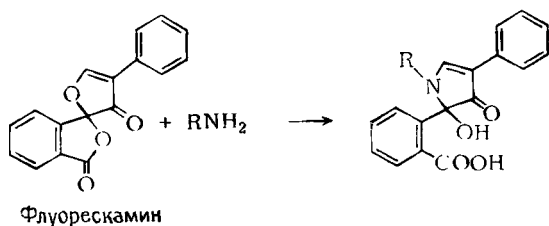
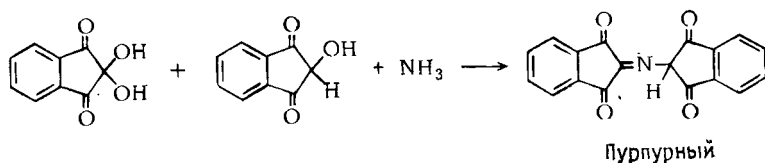
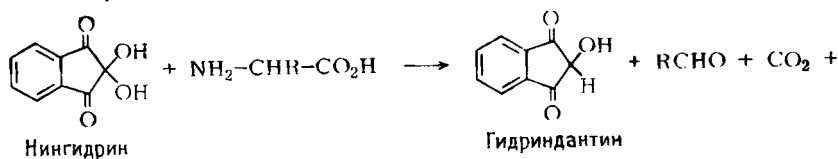
Рис. 4.4. Разделение свободных аминокислот [7].

Неподвижная фаза: а — модифицированный ионами Cu(II) партисил 5; б — модифицированный ионами Cu(II) сферосил ХОА 600; элюент: а — вода/ацетонитрил (52 : 48)/0,15 М аммиак, б — вода/ацетонитрил (50 : 50)/0,17 М аммиак.

4.1.2.2 Лигандообменная хроматография. Лигандообменная хроматография основана на способности анализируемого соединения образовывать лабильные комплексы с ионами, связанными, как правило, с неподвижной фазой ионной, ковалентной или координационной связью. На рис. 4.4 показана хроматограмма 20 распространенных аминокислот, полученная при их разделении посредством двукратного последовательного элюирования, проводимого в изократическом режиме [7]. В использованной авторами этой работы методике лигандообменная хроматография объединена с нормально-фазовой распределительной; разделение проводилось на колонке с немодифицированным силикагелем, обработанным сульфатом меди(II)/аммиаком. При этом ионы меди оказывались прочно связанными с силикагелевой основой. Такая колонка не выдерживает длительного употребления, но стоимость ее невысока, и ее легко изготовить. Обнаружение проводилось при 210 нм.

4.1.2.3. Ионообменная хроматография. Согласно стандартной методике, аминокислоты разделяют на шитых сульфополистирольных смолах, используя цитратные буферные рас-

творы в качестве элюента и послеколоночную модификацию нингидрином, флуорескаминем и фталевым альдегидом для обнаружения (структуры образующихся производных приведены ниже).



Флуорескамин и фталевый альдегид — нефлуоресцирующие реагенты, которые взаимодействуют с первичными аминами в щелочной среде с образованием флуоресцирующих производных. Производные фталового альдегида отличаются большей интенсивностью флуоресценции, чем производные флуорескамина. Кроме того, фталевый альдегид имеет еще одно преимущество по сравнению с флуорескаминем — он растворим в воде. Ни один из реагентов не взаимодействует с вторичными аминами, что исключает возможность обнаружения этим способом пролина. Этот недостаток можно преодолеть, окисляя пролин в элюате гипохлоритом натрия [8, 9] или *N*-хлор-*n*-толилсульфонамидом натрия (хлорамином Т) [10]. Однако очень

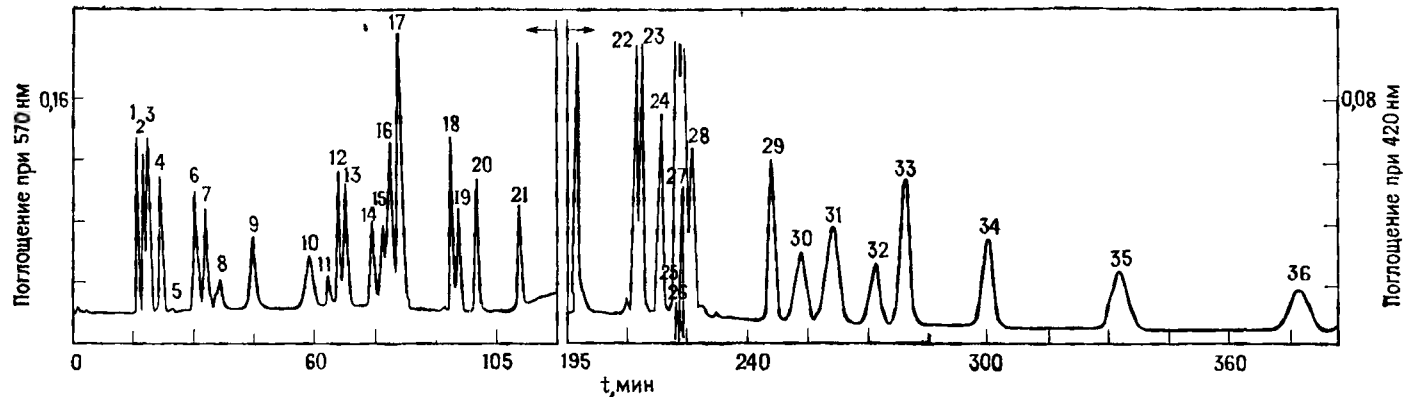


Рис. 4.5. Разделение смеси аминокислот (2,5 нмоль), аминсахаров (4,4 нмоль) и нейтральных сахаров (4,4 нмоль) методом ионообменной хроматографии [11].

Неподвижная фаза: смола DC-8-9 для разделения аминокислот и аминсахаров и смола DA-X-8-8 для разделения нейтральных сахаров; элюент: буферные растворы цитрата и бората натрия, элюирование в градиентном режиме при программировании температуры.

1 — Asp; 2 — Thr; 3 — Ser; 4 — Glu; 5 — Pro; 6 — Gly; 7 — Ala; 8 — Cys; 9 — Val; 10 — Met; 11 — ?; 12 — Ile; 13 — Leu; 14 — Tyr; 15 — Phe; 16 — галактозамин; 17 — глюкозамин; 18 — Lys; 19 — аммиак; 20 — His; 21 — Arg; 22 — сахароза; 23 — трегалоза; 24 — целлобиоза; 25 — мальтоза; 26 — рамиоза; 27 — лактоза; 28 — рибоза; 29 — манноза; 30 — фруктоза; 31 — арабиноза; 32 — галактоза; 33 — ксилоза; 34 — глюкоза; 35 — гентобиоза; 36 — меллибиоза; 37 — фукоза.

важно, чтобы окисляющий агрегат контактировал с элюатом только в необходимый момент времени, так как он способен вызывать разложение других аминокислот.

Используя смолы с малым размером частиц (5 мкм) и чувствительные флуориметрические методы обнаружения, можно проводить идентификацию и количественный анализ аминокислот на субпикомольном уровне.

Тихомиров и др. [11] описали метод одновременного обнаружения аминокислот, аминсахаров и нейтральных сахаров (рис. 4.5). Для обнаружения аминокислот эти авторы использовали нингидрин, а для обнаружения сахаров — смесь орсин/серная кислота.

Дрешер и Ли [10] опубликовали метод аминокислотного анализа белков, элюированных из полиакриламидного геля. После экстракции окрашенной полосы белка из геля с помощью додецилсульфата натрия и последующего гидролиза под действием метансульфокислоты они проводили анализ полученной смеси аминокислот на катионообменной колонке. Для обнаружения применялась постколоночная модификация фталевым альдегидом, часть элюата, содержащая пролин, предварительно обрабатывалась хлорамином Т для окисления пролина. Полученная этим методом хроматограмма приведена на рис. 4.6.

Позднее Дрешер и др. [12] описали систему ВЭЖХ для анализа большого числа аминокислот и родственных им соединений, содержащихся в биологических жидкостях. Разделение эти авторы выполняли на катионообменной смоле (с частицами размером 5 мкм), элюируя пробу буферными растворами цитрата лития в градиентном температурном режиме. Обнаружение осуществлялось флуориметрически после реакции с фталевым альдегидом. Предел обнаружения описанным методом равен примерно 0,5 пмоль, длительность анализа 5 ч. Хроматограмма, полученная этим методом, представлена на рис. 4.7.

В 1982 г. авторы работы [13] сообщили о разделении смеси аминокислот, обычно присутствующих в белковых гидролизатах, которое они провели за 45 мин на стандартном оборудовании для ВЭЖХ, обычно применяемом для разделения пептидов и белков. Неподвижной фазой служила катионообменная смола, элюентом — формиатный буферный раствор. Нижний предел обнаружения составлял несколько наномолей, если реагентом служил нингидрин, и несколько пикомолей, если реагентом был фталевый альдегид.

Авторы работы [14] использовали для разделения аминокислот генерируемую растворителем (динамическую) ионообменную систему, состоящую из гидрофобной неподвижной фазы (обращенная фаза C_8) и элюента, представляющего собой смесь вода/органический растворитель с небольшой добавкой

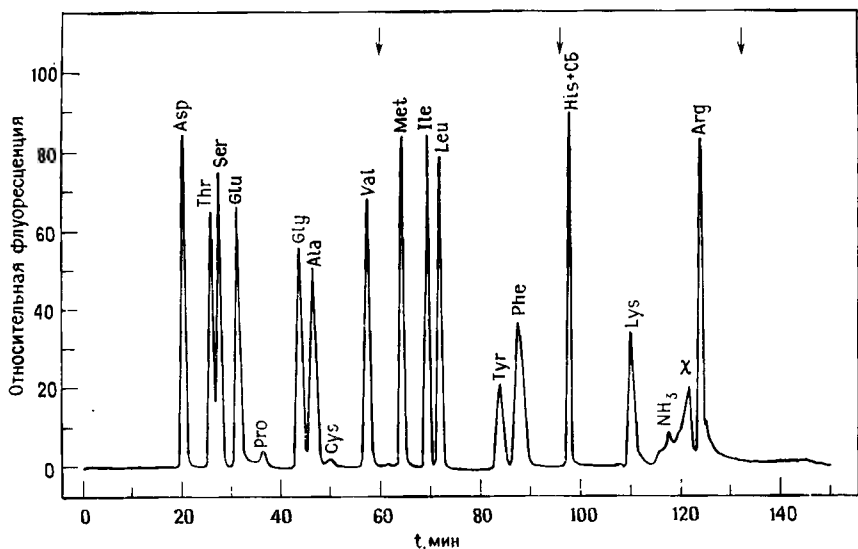


Рис. 4.6. Разделение аминокислот (300 пмоль) [10].

Неподвижная фаза: катионообменный аминко J5-7409; элюент: буферные растворы формата и бората натрия (рН 3,25–10,8), элюирование в градиентном режиме; температура: 51 °С.

СВ — пик, появление которого обусловлено сменой буферного раствора.

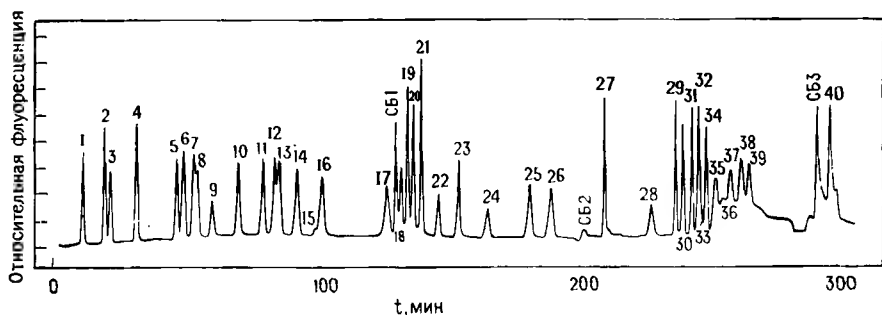


Рис. 4.7. Разделение аминокислот и родственных им соединений методом ионообменной хроматографии [12].

Неподвижная фаза: аминко J5-7409; элюент: буферные растворы цитрата лития (рН 3,2–7,7); температура: 37–62 °С.

1 — фосфо-Ser; 2 — таурин; 3 — фосфоэтаноламин; 4 — Asp; 5 — Thr; 6 — Ser; 7 — Glu; 8 — Asp; 9 — Gln; 10 — α-аминокислота; 11 — Gly; 12 — Ala; 13 — цитрулин; 14 — Abu; 15 — Cys; 16 — Val; 17 — Met; 18 — ?; 19 — Ile; 20 — Leu; 21 — Ile; 22 — Tyr; 23 — Phe; 24 — гомоцистин; 25 — β-Ala; 26 — β-Alb; 27 — γ-Alb; 28 — Trp; 29 — His; 30 — His (3-Me); 31 — His (1-Me); 32 — карнозин; 33 — Hyl; 34 — ансерин; 35 — этаноламин; 36 — аммиак; 37 — Orn; 38 — Lys; 39 — α-аминно-β-гуанидинпропеновая кислота; 40 — Arg; CB1, CB2, CB3 — пики, появление которых обусловлено сменой буферного раствора.

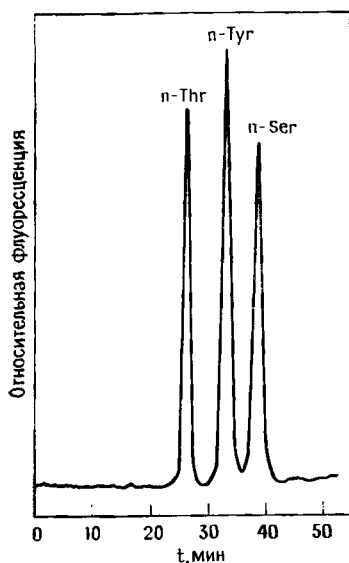


Рис. 4.8. Разделение фосфогидроксиаминокислот методом ионообменной хроматографии [16].

Неподвижная фаза: партисил 10 SAX; элюент: 10 мМ буферный раствор фосфата калия (рН 3)/12,5%-ный метанол (по объему).

анионного детергента. Гидрофобные части молекул детергента связываются в результате гидрофобного взаимодействия с обращенной фазой, а свободные заряженные гидрофильные группы выполняют ионообменные функции. Обнаружение осуществлялось после проведения реакции с нингидрином. В указанной работе подробно обсуждается влияние ряда хроматографических параметров. Создается впечатление, что такие системы с генерируемым растворителем ионообменными свойствами обладают лучшей селективностью, чем традиционные ионообменные системы.

Методом ВЭЖХ можно также анализировать фосфогидроксиаминокислоты (фосфосерин, фосфотреонин, фосфотирозин). В литературе описаны два метода разделения соединений этого класса. Сваруп и др. [15] разделяли фосфогидроксиаминокислоты на анионообменной неподвижной фазе ультрасил АХ, используя в качестве элюента фосфатный буфер (рН 7,8). Обнаружение проводилось по поглощению при 206 нм. В более поздней работе Янга и др. [16] описан метод разделения с полным разрешением пиков (до нулевой линии) смеси фосфогидроксиаминокислот на анионообменной смоле партисил в результате элюирования смесью фосфатный буфер (рН 3,0)/метанол. Обнаружение проводилось флуориметрически после обработки элюата фталевым альдегидом. Предел обнаружения составлял 10 пмоль. Хроматограмма, полученная этим способом, представлена на рис. 4.8.

4.1.3. Модифицированные аминокислоты

Разделение модифицированных аминокислот играет важную роль во многих методах исследования химии белка. Как уже говорилось ранее, модификация аминокислот проводится с целью улучшения их хроматографических характеристик и характеристик, влияющих на их обнаружение, например коэффициент поглощения и длины волны, соответствующей максимуму поглощения. Кроме того, модификация используется для маркировки аминокислотных остатков пептидов и белков, особенно N-концевого аминокислотного остатка, т. е. остатка, имеющего свободную α -аминогруппу. Меченый остаток можно в зависимости от природы метки отщепить путем гидролиза в присутствии сильной кислоты или в результате внутримолекулярной перегруппировки, индуцированной меткой. Производные аминокислот, отщепляющиеся от пептидных цепей, могут быть точно такими же, как и образующиеся при модификации свободных аминокислот.

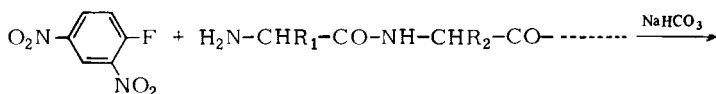
В процессе любой реакции модификации аминокислот в первую очередь образуют производные по α - и ϵ -аминогруппе, если таковая имеется. В ряде случаев модифицируются и другие реакционноспособные группы, содержащиеся в боковой цепи, например имидазольная, фенольная, гидроксильная, сульфгидрильная. Кроме того, на последней стадии реакции модификации подвергаются α -карбоксильные группы аминокислот.

Наиболее широкое распространение в качестве реагентов для модификации получили арилфториды или хлориды (реагенты типа реагентов Сэнгера), альдегиды и изотиоцианаты (реагенты типа реагентов Эдмана). Все они пригодны для модификации свободных аминокислот, а также для введения метки при определении N-концевой аминокислоты (за исключением альдегидов). Только изотиоцианаты образуют производные с пептидами и белками, модифицированную аминокислоту из которых можно избирательно отщепить без разрушения остающейся пептидной цепи. Таким образом, прямой анализ аминокислотной последовательности производится исключительно с реагентами этого типа.

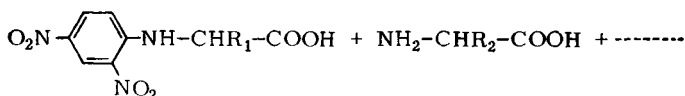
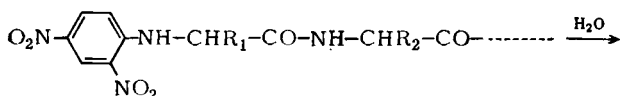
4.1.3.1. Динитрофениламинокислоты (ДНФ-аминокислоты).

Одним из первых реагентов, примененных для введения метки в α -аминогруппы аминокислот и пептидов, был фтординитробензол [17]. Реакционноспособные аминогруппы боковых цепей под действием этого реактива также модифицируются, и для отщепления модифицированных аминокислот от пептидной цепи требуется кислотный гидролиз. Окрашенные в желтый цвет ДНФ-аминокислоты можно идентифицировать методом бумажной хроматографии, тонкослойной хроматографии и

ВЭЖХ. Анализ их методом ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования описан в работе [18].

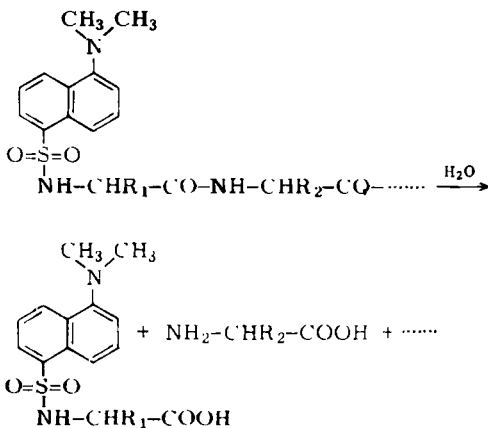
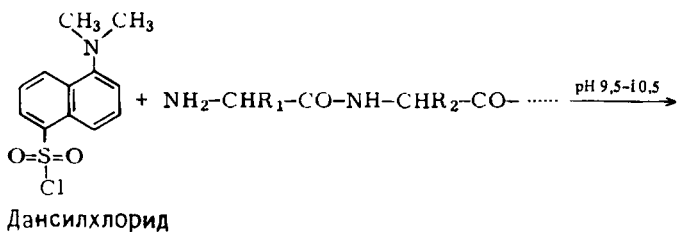


Фтординитробензол



ДНФ-производное аминокислоты

4.1.3.2. Диметиламинонафталинсульфониламинокислоты (дансиламинокислоты). В результате взаимодействия первичных и вторичных аминогрупп аминокислот с дансилхлоридом — реагентом типа реагента Сэнгера — образуются дансильные производные аминокислот, которые характеризуются сильной флуоресценцией. Однако дансилхлорид взаимодействует не только с α -амино- и иминогруппами аминокислот, но также и с некоторыми реакционноспособными группами боковых цепей, в том числе с ϵ -аминогруппой Lys, имидазольным кольцом His и гидроксильной группой Thr. Дансильные производные аминокислот образуются также в результате взаимодействия пептидов или белков с дансилхлоридом и последующего гидролиза полученного продукта соляной кислотой. В этом случае дансильная метка вводится только по α -аминогруппе исходной N-концевой аминокислоты (и некоторым реакционноспособным группам боковых цепей), которую в дальнейшем можно идентифицировать методом ТСХ или ВЭЖХ. Эта процедура широко используется в качестве непрямого метода установления аминокислотной последовательности, получившего название дансильного метода Эдмана, разработанного Греем и Хартли [19]. Следует отметить, что при установлении аминокислотной последовательности описанным способом некоторые аминокислоты модифицируются или разрушаются в процессе кислотного гидролиза. Например, аспарагин и глутамин дезаминируются, триптофан разрушается, а многочисленные модифицированные аминокислоты теряются в процессе анализа. Тем не менее дансильные производные аминокислот весьма удобны для аминокислотного анализа, так как их мож-



Дансильное производное аминокислоты

но обнаруживать на фемтомольном уровне, если пользоваться неводными буферными растворами во избежание тушения флуоресценции.

Байер и сотр. [20] первыми опубликовали сообщение о разделении дансильных производных аминокислот методом ВЭЖХ на двухколоночной системе с лихросорбом Si60 (5 мкм) за 30 мин [20]. Разделение проводилось при температуре 65 °С при градиентном элюировании смесями бензол/пиридин/уксусная кислота/пиридин/уксусная кислота. При использовании флуоресцентного детектора (длина волны возбуждающего излучения 340 нм, испускаемого 510 нм) предел обнаружения составляет порядка нескольких фемтомолей. В этой же работе описана обращенно-фазовая система, при помощи которой можно разделить большинство дансильных производных стандартных аминокислот.

В литературе было описано несколько удобных способов разделения всех аминокислот, образующихся при кислотном или ферментативном гидролизе белков [21—24, 405]. Примером может служить хроматограмма, показанная на рис. 4.9

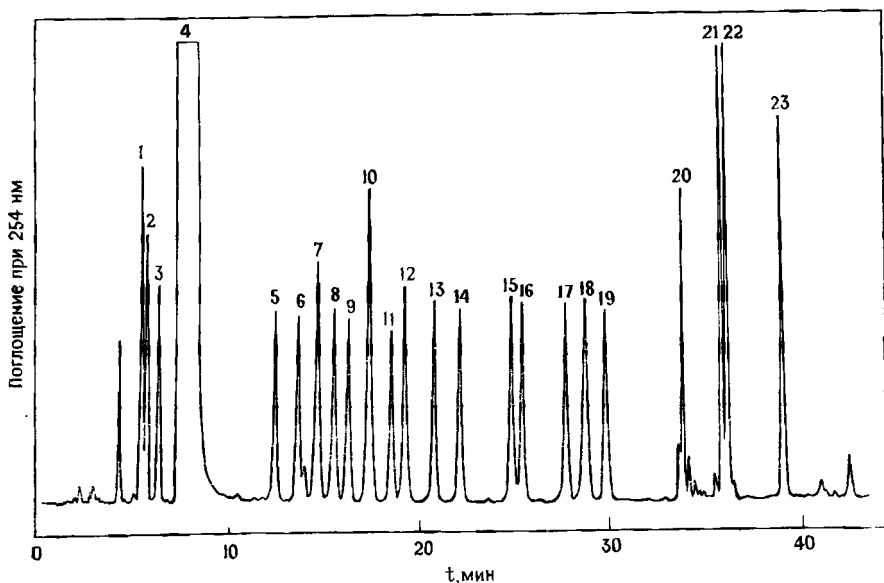
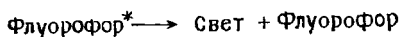
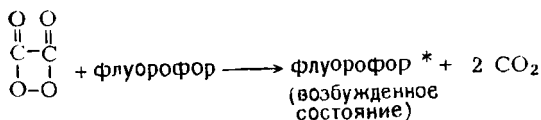
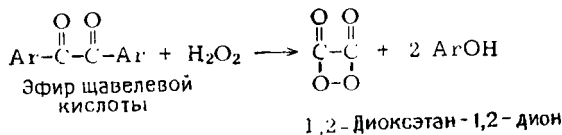


Рис. 4.9. Разделение дансильных производных аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [24].

Неподвижная фаза: сферисорб гексил, 5 мкм; элюент: фосфат, pH 6,0/ацетонитрил; элюирование в градиентном режиме; температура: 34 °C.
 1 — цистени; 2 — Asp; 3 — Glu; 4 — дансилсульфокислота; 5 — Ser; 6 — Thr; 7 — Gly; 8 — Ala; 9 — Met (O); 10 — Abu; 11 — Arg; 12 — Pro; 13 — Val; 14 — Met; 15 — Ile; 16 — Leu; 17 — Phe; 18 — дансилхлорид; 19 — цистин; 20 — дансиламид; 21 — Lys; 22 — His; 23 — Tug.

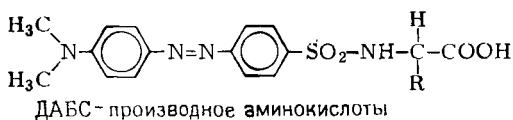
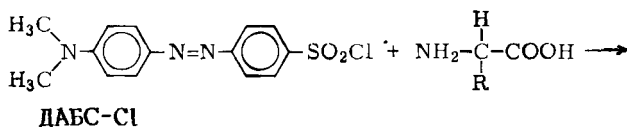
[24]. Методика воспроизводимого модифицирования аминокислот с высоким выходом приведена в работе [25].

Предел обнаружения дансильных производных флуоресценции можно улучшить, если для возбуждения флуоресценции вместо УФ-излучения использовать химическую реакцию [26]. Хемилюминесценция дансильных производных аминокислот может быть вызвана в результате взаимодействия с бис-



(2,4,6-трихлорфенил) оксалатом и пероксидом водорода. Предполагаемый механизм этой реакции показан выше на схеме. В этом случае предел обнаружения может быть даже менее одного фемтомоля.

4.1.3.3. Диметиламиноазобензолсульфониламинокислоты (ДАБС-аминокислоты). Авторы работы [27] описали систему, предназначенную для анализа аминокислот с пределом обнаружения на уровне нескольких пикомолей и использованием предколоночной модификации свободных аминокислот ДАБС-хлоридом — еще одним из реагентов типа реагента Сэнгера [27].



При тщательно подобранных условиях эта реакция воспроизводима. ДАБС-производные аминокислот разделяются методом обращенно-фазовой хроматографии при градиентном элюировании с использованием двух различных систем. Поскольку эти производные имеют интенсивную окраску, обнаружение проводится по поглощению в видимой области (при 436 нм), достигаемый предел обнаружения составляет 3—5 пмоль каждой аминокислоты. Все стандартные аминокислоты, присутствующие в белковом гидролизате, за исключением Asp и Ser, разделяются при градиентном элюировании смесью 50 мМ ацетат натрия, pH 4,13/ацетонитрил. Неразрешающиеся аминокислоты можно разделить, проводя элюирование второй системой 28 мМ фосфатный буфер, pH 7,2/ацетонитрил, однако все остальные ДАБС-производные аминокислот разделяются в этом случае значительно хуже, чем в первой системе.

4.1.3.4. Нитробензоксадиазолпроизводные (НБД-производные). Авторы работы [28] использовали НБД-фторид в качестве реагента для предколоночного введения флуоресцентной метки и разделили полученные производные, в том числе Pго и Нур, методом ВЭЖХ [28]. Пробу обрабатывали НБД-фторидом при pH 8,0 и 60 °C в течение минуты. Производные 18 аминокислот были разделены на обращенной фазе, причем их

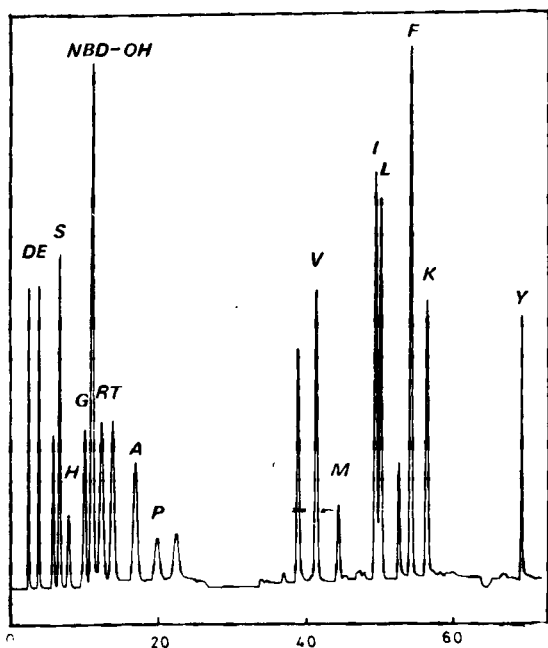
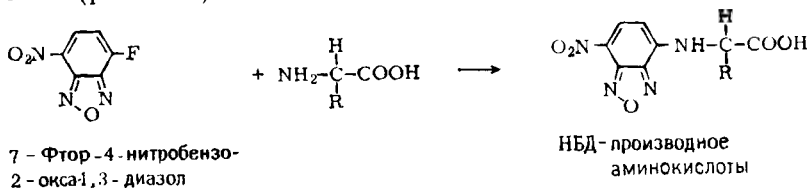


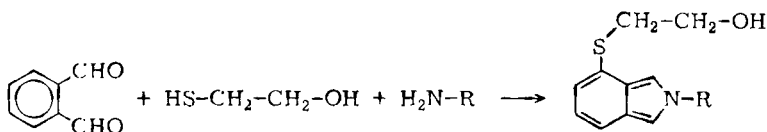
Рис. 4.10. Разделение НБД-производных аминокислот (10 пмоль) методом обращенно-фазовой хроматографии [28].

Неподвижная фаза: μ -боида-лак C_{18} , 10 мкм; элюент: 0,1 М фосфат (рН 6,0)/метанол/тетрагидрофуран.

предел обнаружения может составлять 10 фмоль, если длина возбуждающего излучения составляет 470 нм, а испускаемого 530 нм (рис. 4.10).



4.1.3.5. Фталевого альдегида производные (ФА-производные). Предколониальная модификация фталевым альдегидом очень часто используется для определения аминокислот в биологических жидкостях и белковых гидролизатах. Нефлуоресцирующий реагент взаимодействует в присутствии восстановителя, например меркаптоэтанола, с первичными аминогруппами, и образует флуоресцирующие производные. Этим методом не-



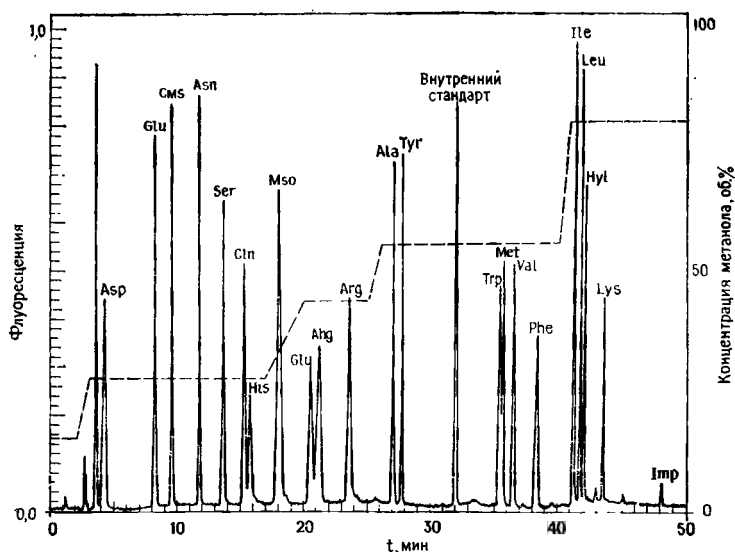


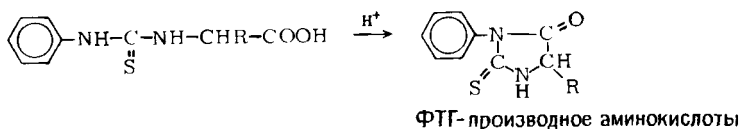
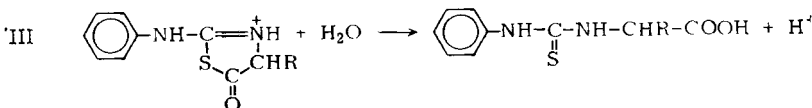
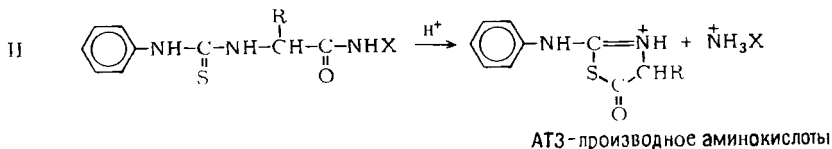
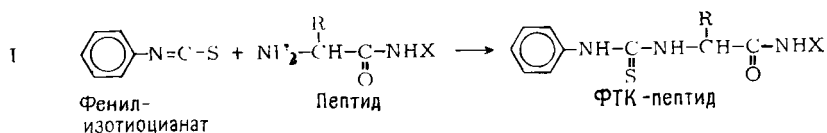
Рис. 4.11. Разделение производных аминокислот и фталевого альдегида методом обращенно-фазовой хроматографии [30].

Неподвижная фаза: ультрасфер ODS, 5 мкм; элюент: ТГФ/0,05 М ацетат натрия (рН 6,6)/метанол, линейно-ступенчатое градиентное элюирование.

возможно определять пролин, а цистеин дает очень слабый сигнал. Предварительная обработка пробы иодуксусной кислотой приводит к образованию производных цистеина, обладающих интенсивной флуоресценцией [29]. Разделение ФА-производных аминокислот обычно выполняют на обращенных фазах за 30—50 мин, используя многоступенчатое градиентное элюирование и флуоресцентный детектор (длина волны возбуждающего излучения около 330 нм, испускаемого 460 нм). Как показали авторы работы [30], предел обнаружения может достигать нескольких пикомолей (рис. 4.11) [30]. В работах [31, 32] описаны другие хорошие системы для разделения ФА-производных аминокислот. Авторы работы [33] обрабатывали аминокислоты смесью фталевый альдегид/этандиол, получаемые при этом производные отличаются более интенсивной флуоресценцией [33].

4.1.3.6. Фенилтиогидантоинпроизводные (ФТГ-производные). Оригинальным реагентом, используемым для непосредственного анализа аминокислотных последовательностей, является фенилизотиоцианат (ФИТЦ) или реагент Эдмана, впервые описанный более 30 лет назад [34]. С его помощью выполнена большая часть работ по установлению первичной

структуры белков. При последовательном разложении пептидов протекает такая серия реакций [35]:



Реакции I, II, III называются реакциями сочетания, расщепления и конверсии соответственно. Продукты этих реакций — фенилтиокарбамилпроизводные (ФТК-производные) пептидов или аминокислот, анилинотиазолинонпроизводные (АТЗ-производные) и фенилтиогидантоиновые производные (ФТГ-производные) аминокислот соответственно. Эти реакции очень часто выполняются автоматически в белково-пептидном секвенаторе. Конечные продукты реакции, ФТГ-производные аминокислот, можно идентифицировать при помощи бумажной, тонкослойной или газовой хроматографии [35], методом аминокислотного анализа после проведения гидролиза, масс-спектрометрии или разработанной позднее ВЭЖХ. Внедрение ВЭЖХ [37] коренным образом изменило процедуру установления последовательности благодаря значительному снижению количества материала, необходимого для проведения анализа, так как метод ВЭЖХ на три порядка чувствительнее, чем, например, тонкослойная хроматография, и допускает количественную обработку результатов. Во многих лабораториях достигнут предел обнаружения около 5 пмоль, обнаружение осуществляется по поглощению в УФ-области при 254—269 нм.

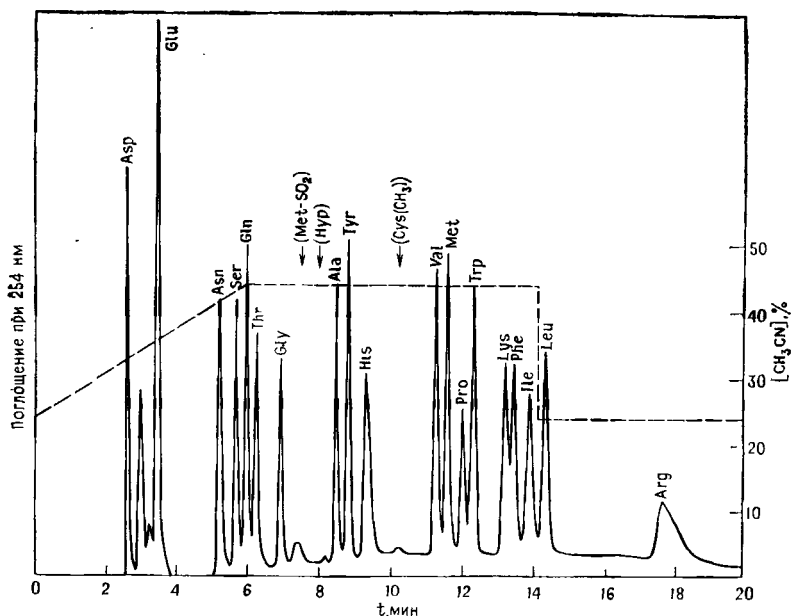


Рис. 4.12. Разделение ФТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [37].

Неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: 0,01 М ацетат натрия/ацетонитрил, градиентное элюирование, температура: 62 °C.

Задача разделения ФТГ-производных стандартных аминокислот весьма сложна из-за больших различий их полярности. Авторы одной из первых работ, проводимых в рассматриваемом направлении, [38] решили эту проблему следующим образом: гидрофобные и гидрофильные производные аминокислот разделяются на различных колонках путем изократического элюирования. Эта система до сих пор не потеряла своего значения, так как оборудование, используемое для разделения, очень несложно, а длительность анализа невелика. Несколько лет позднее было впервые успешно проведено разделение производных всех стандартных аминокислот на одной колонке с применением градиентного элюирования. Соответствующая хроматограмма представлена на рис. 4.12.

В настоящее время число систем, предназначенных для хроматографического разделения аминокислот, весьма велико; некоторые из наиболее удачных систем представлены в табл. 4.2.

В основу многих из таких систем положена оригинальная схема градиентного элюирования, разработанная Циммерманом и др. [37]; см., например, рис. 4.13.

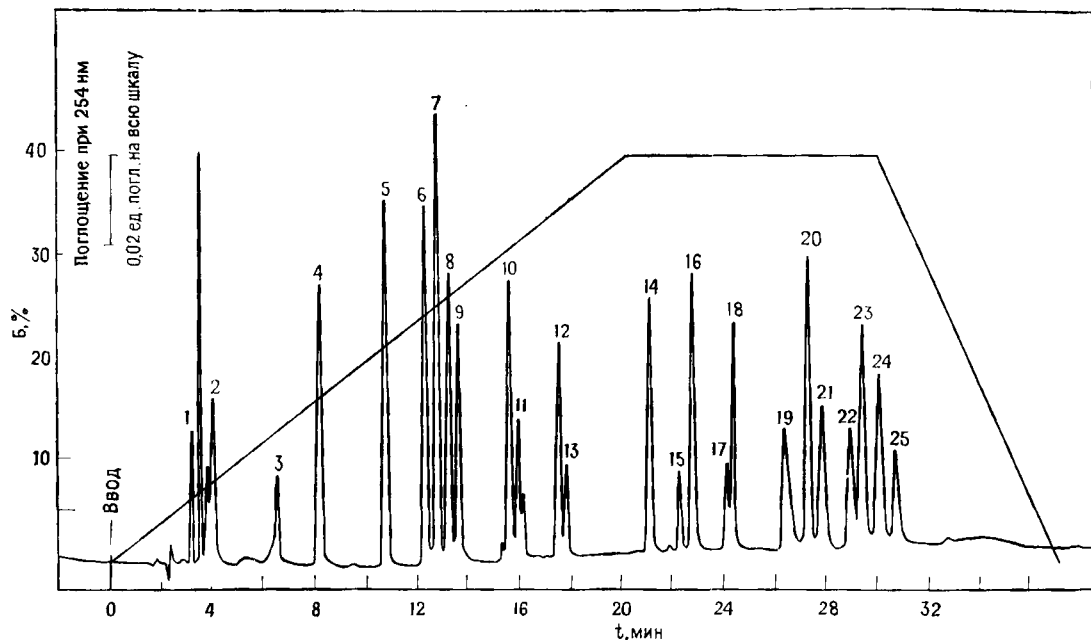


Рис. 4.13. Разделение ФТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [43].

Неподвижная фаза: ультрасфер ODS; элюент: 5% ТГФ в 0,042 М ацетате натрия (pH 5,16)/10%-ный ТГФ - ацетонитрил; температура: 45 °С.

1 — цистеиновая кислота; 2 — Asp; 3 — Cys (CM); 4 — Glu; 5 — Asn; 6 — Ser; 7 — Gln; 8 — Thr; 9 — Gly; 10 — His; 11 — Met(O₂); 12 — Ala; 13 — Hyp; 14 — Tyr; 15 — Cys(Me); 16 — Pro; 17 — Met; 18 — Val; 19 — Arg; 20 — Trp; 21 — Phe; 22 — Ile; 23 — Lys; 24 — Leu; 25 — Nle.

Таблица 4.2. Системы для разделения феилтиогидантоиновых производных

Неподвижная фаза	Режим элюирс- вания ^а	Время анализа, мин	Темпе- ратура, °C
Зорбакс ODS	г	20	62
	г	48	~20
Сферисорб S5-ODS	г	23	37
Зорбакс CN	г	28	31
μ-Бондапак фенил	г	60	?
Ультрасфер ODS	г	37	45
μ-Бондапак C ₁₈	г	30	37
Зорбакс ODS	г	26	55
Зорбакс CN	г	36	31
Ультрасфер ODS	г	13	50
Зорбакс ODS	г	19	62
Si 60	и	2×5	~20
Зорбакс ODS	и	14	55
R-Sil C-18	и	23	64
Зорбакс ODS+	и	35	52
+лихросорб RP-18			
Зорбакс ODS	и/г	20	60
Лихросорб RP 18	и	14	62
Ультрасфер ODS	и	9	55
Ультрасфер ODS	и	20	55

^а г — градиентное, и — изократическое элюирование. ^б В скобках даны не вполне

Однако системы, в которых используется градиентное элюирование, имеют ряд недостатков, поэтому разработка методик изократического разделения не прекращалась. Примеры такого варианта разделения приведены в табл. 4.2 и на рис. 4.14.

Изократическое элюирование ФТГ-производных аминокислот имеет ряд следующих преимуществ перед градиентным элюированием: хорошая воспроизводимость при разделении чрезвычайно сложных проб, особенно после смены колонки, удовлетворительно разрешение большого числа проб и — самое важное — высокая стабильность нулевой линии детектора

(ФТГ) аминокислот

Неразделяющиеся стандартные аминокислоты ^б	Дополнительно разделяющиеся аминокислоты и их производные	Литература
Val/Met, Arg? His?	Met(O ₂), Hyp, Cys(Me)	37
(Val/Met)	Hyp	39
(Ile/Trp/Phe/Leu)	Cys(CH ₂ CONH ₂), Hyp	40
		41
		42
	Met(O ₂), Hyp, Cys(Me), Nle	43
	Nva	44
Arg? His?		45
Asp? Glu?	Asp(OMe), Glu(OMe)	46
Glu/Asn	Met(O), Asp(OMe), Glu(OMe), Cys(CH ₂ COOMe), Nle, ФТГ-Gly(OMe), ФТГ-P(OMe), PTU, DPTU	47
Pro/Trp	Аминокислоты с защитой в боковой цепи	48
Arg? His?	Asp(OMe), Glu(OMe)	38
Ser/Gln	Hyp, сукцинил-Lys, Nle	49
(Gln/Ser)		50
Ser?	Nle	51
	Nle	52
(Gln/Ser)	Met(O ₂), Hyp, Asp(OMe), Glu(OMe), Aib, Abu, Cys(Me), Cys(CH ₂ COOMe), Hyl, Nva, Cys(ФТГАet), Nle, PTU, DPTU	53
	Asp(OMe), Glu(OMe), Abu, Cys(Me), Cys(CH ₂ COOMe), Cys(пиридилэтил), Cys(сульфопропил), ацетил-Lys, сукцинил-Lys(OMe), Nle, ФТГ-Gly(OMe), ФТГ-Pro(OMe), PTU, DPTU	54
(His/Ala)		55

хорошо разделяющиеся соединения.

при высокой чувствительности. Кроме того, возможность использования более простой установки ВЭЖХ.

Как следует из табл. 4.2, выбор условий, при которых можно разделить все стандартные аминокислоты и многие их производные, достаточно велик. Проблемы возникают только при разделении групп Ser/Gln, Met/Val/Pro и Phe/Ile/Lys/Leu. Особенно тщательно следует подбирать температуру, pH, форму градиента или состав растворителя, так как все эти параметры играют важную роль в процессе разделения. Установлено, что время удерживания Arg и His меняется в зависимости

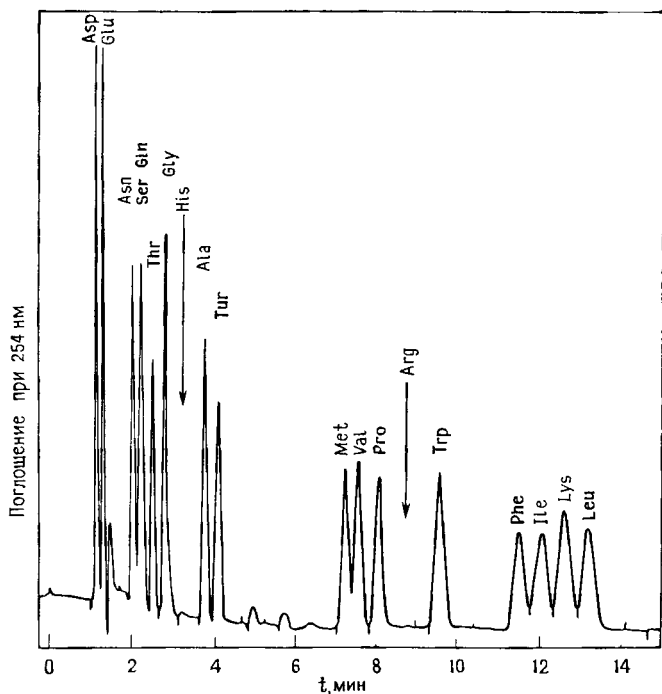


Рис. 4.14. Разделение ФТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [53].

Неподвижная фаза: лихросорб RP-18 (5 мкм); элюент: 68,5% ацетат натрия (рН 5,2)/31,5% ацетонитрил/0,5% дихлорэтан, изократическое элюирование; температура: 62 °С.

от времени жизни колонки, но эти сдвиги можно полностью откорректировать, меняя концентрацию буфера [53].

4.1.3.7. Диметиламиноазобензолтиогидантоиновые производные (ДАБТГ-производные). В анализе аминокислотной последовательности пептидов классический реагент фенилизотиоцианат можно заменять на диаминобензолизотиоцианат (ДАБИТЦ), который дает окрашенные ДАБТГ-производные аминокислот. Их можно регистрировать в видимой области при 436 нм с пределом обнаружения от 1 до 5 пмоль. В работе [56] описано разделение ДАБТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 4.15) [56].

Одна пара ДАБТГ-производных аминокислот, а именно Leu/Ile не разделяется. Следует отметить, что все ДАБТГ-производные стандартных аминокислот можно разделить методом ТСХ с приблизительно таким же пределом обнаружения. Кроме того, ТСХ позволяет различать ДАБТГ- и ДАБТК-производные (диметиламиноазобензолтиокарбамил), т. е. различные

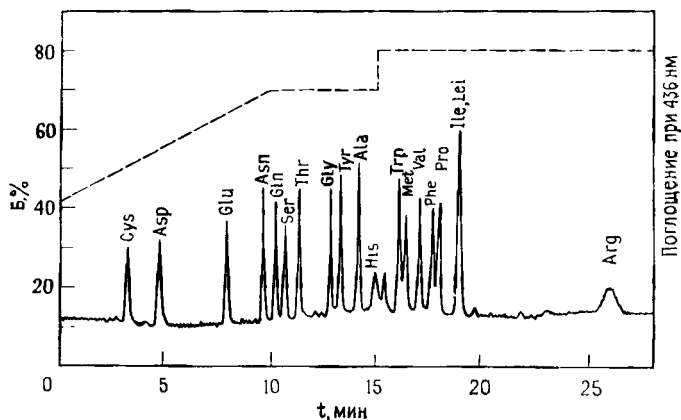
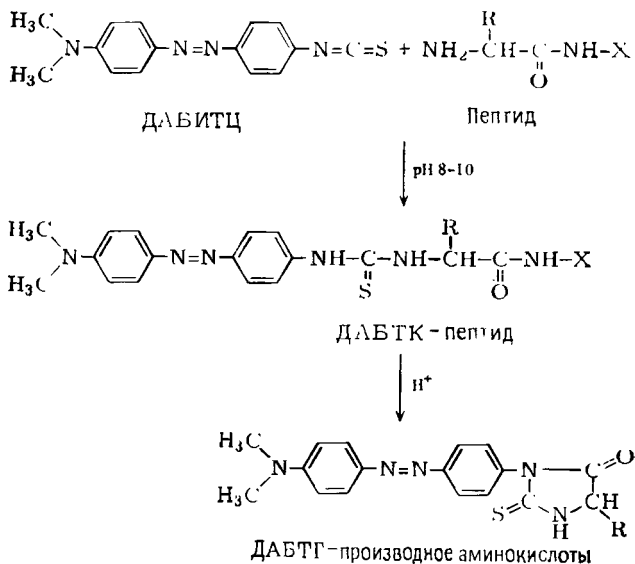


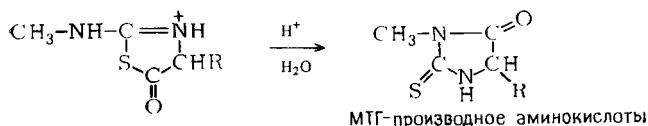
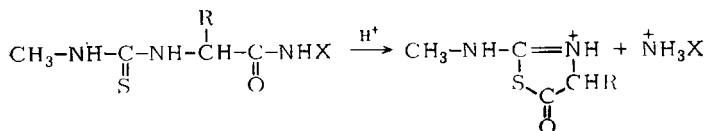
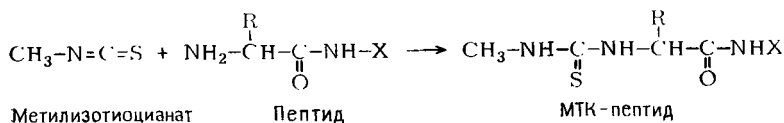
Рис. 4.15. Разделение ДАБТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [56].

Неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: 0,035 М ацетат (рН 5,0)/ацетонитрил, градиентное элюирование; температура: 22 °С.

продукты, образующиеся в процессе последовательного расщепления пептидов, так как эти производные окрашены по-разному. Главное преимущество ВЭЖХ-анализа ДАБТГ-производных аминокислот — возможность количественной обработки результатов. Следует, однако, помнить, что реакция сочетания ДАБИТЦ с пептидными аминогруппами не дает количественного выхода.



4.1.3.8. Метилтиогидантоиновые производные (МТГ-производные). Последовательное расщепление пептидов и белков может быть выполнено с использованием метилизотиоцианата (реагента типа реагента Эдмана).



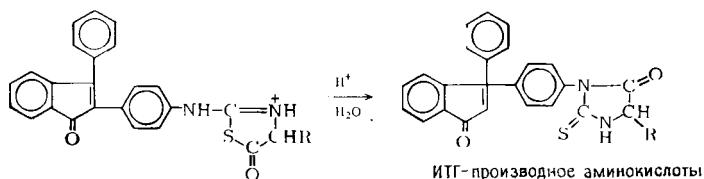
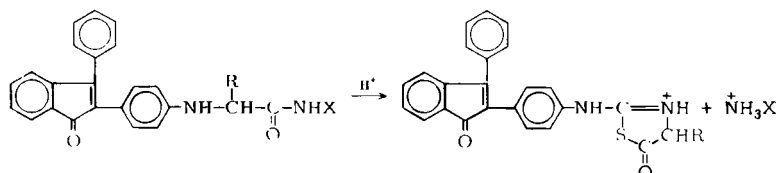
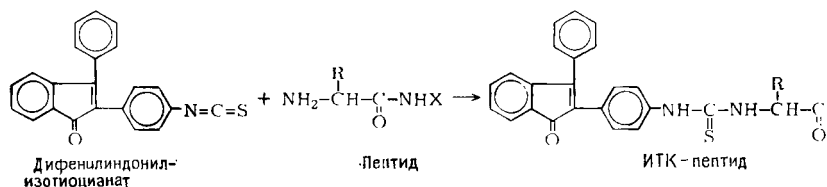
Конечные продукты, т. е. МТГ-производные аминокислот, анализируют обычно методами ТСХ, ГХ и масс-спектрометрии. В работе [57] описан анализ МТГ-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием градиентного элюирования. Этим методом было разделено большинство из 20 наиболее распространенных аминокислот.

4.1.3.9. Дифенилинденонилтиогидантоиновые производные (ИТГ-производные). К числу реагентов, предназначенных для анализа аминокислотной последовательности пептидов, дающих окрашенные производные, относится также дифенилинденонилизотиоцианат (см. схему на стр. 199).

Окрашенные ИТГ-производные аминокислот до последнего времени идентифицировали только методом ТСХ. Однако автор работы [58] опубликовала сообщение о разделении этих производных методом ВЭЖХ. Проводя элюирование тремя различными системами растворителей, можно разделить почти все ИТГ-производные аминокислот.

4.1.4. Энантиомерные аминокислоты

Методы разделения пар энантиомеров аминокислот, т. е. их L- и D-форм, приобретают все большее значение. При проведении биохимических исследований и разработке и исследовании фармацевтических препаратов и продуктов питания необ-



ходимы как аналитические, так и препаративные методы разделения, поскольку D- и L-аминокислоты отличаются не только по физико-химическим, но и по биологическим свойствам. Раньше энантиомерные формы аминокислот разделяли методами избирательной кристаллизации или селективного расщепления под воздействием оксидазы аминокислот или после превращения в соответствующие диастереоизомерные дипептиды методами газовой хроматографии или аминокислотного анализа. В настоящее время разработаны хиральные неподвижные фазы для газовой и жидкостной хроматографии [59].

Предложено несколько различных способов разделения энантиомеров аминокислот методом ВЭЖХ. Один из таких способов — конверсия аминокислот в диастереомерные пептиды посредством реакции с N-карбоксиангидридом и последующее разделение методом обращенно-фазовой хроматографии [59]. Он позволяет определять оптическую чистоту большинства наиболее распространенных аминокислот, регистрируя содержание оптического антипода до 0,01%. Данным способом можно также разделять Thr и Ile (рис. 4.16).

Другой способ ВЭЖХ-разделения энантиомеров аминокислот основан на использовании хиральной подвижной фазы. Немодифицированные аминокислоты разделяют на обращенных фазах, элюируя смесями, содержащими медные комплексы L-Pro, L-Asp-циклогексиламида [60], N-(*n*-толуолсульфонил)-L-Phe [61], N-(*n*-толуолсульфонил)-D-Phe-Gly [62] или

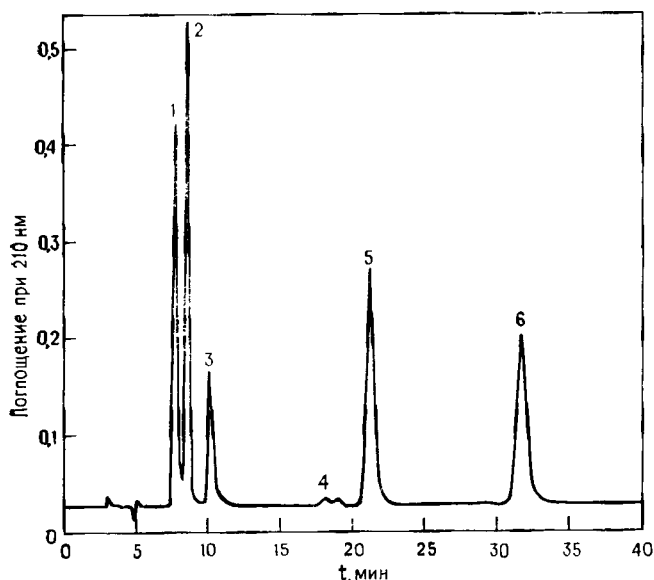


Рис. 4.16. Разделение реакционной смеси L-Thr, L-allo-Thr, D-Thr и D-allo-Thr после реакции с L-Phe-N-карбоксиангидридом методом обращенно-фазовой хроматографии [59].

Неподвижная фаза: нуклеосил 5 C_{18} ; элюент: 0,1 М фосфорная кислота — двузамещенный фосфат калия (рН 4,5)/ацетонитрил (97 : 3).
 1 — L-Phe-L-Thr; 2 — L-Phe-L-allo-Thr; 3 — Phe; 4 — L-Phe-D-allo-Thr; 5 — L-Phe-D-Thr; 6 — (L-L)-гидантоиновая кислота?

N,N-ди-*n*-пропил-L-Ala [63]. В большинстве случаев элюаты подвергали до обнаружения модификации. В работе [62] показан механизм лигандного обмена между двумя формами аминокислот и тозиламинокислотным комплексом меди, связанным с неподвижной фазой. В литературе описано разделение очень большого числа аминокислот. Примером тому может служить работа [63] (рис. 4.17).

Третий способ разделения энантиомеров аминокислот основан на использовании хиральных неподвижных фаз, ряд которых был опубликован в литературе. В этом методе также применяется образование комплексов с ионами меди. Авторы работы [64, 65] описали разделение многих пар энантиомеров на полистирольных смолах с привитым медным комплексом (R)-N,N-дибензилпропандиамина [64] и на обращенно-фазовых носителях с привитым медным комплексом N-алкил-L-гидроксипролина [65]. Как показал автор работы [66], на неподвижных фазах на основе силикагеля с привитыми ионными комплексами меди или кадмия с L-Про-амидом можно разделить большое число пар энантиомеров [66]. Для успешного

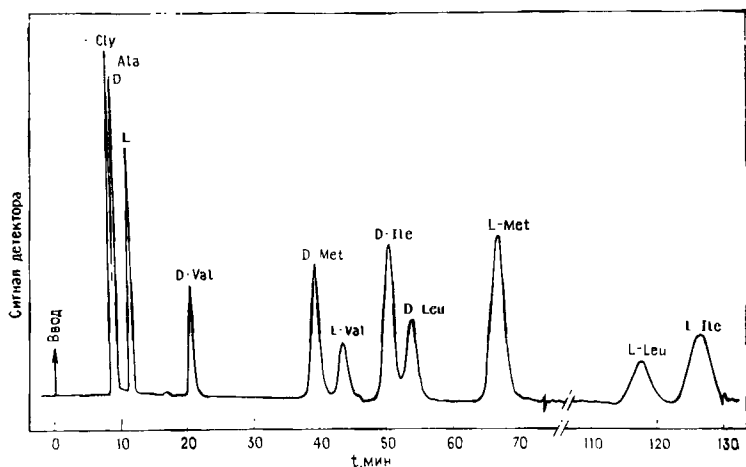


Рис. 4.17. Разделение энантимеров аминокислот методом обращенно-фазовой хроматографии [63].

Неподвижная фаза: сферисорб LC 18, 5 мкм; элюент: 0,008 М N,N-ди-*n*-пропил-L-аланин и 0,004 М ацетат меди(II) (pH 5,5), 1%-ный ацетонитрил.

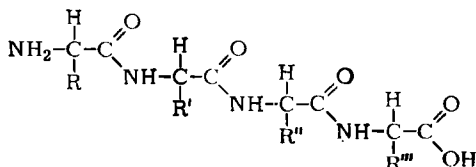
разделения многочисленных пар энантимеров был использован гидрофильный гель TSK 2000 PW с привитым комплексом меди и L-Phe, L-Trp или L-His [67]. Большинство авторов осуществляли обнаружение по поглощению в УФ-области.

Следует также отметить, что оптические изомеры дансил-производных аминокислот и эфиров N-ацетиламинокислот были также разделены методом ВЭЖХ с использованием хиральной подвижной и хиральной неподвижной фаз соответственно [68, 70].

4.2. Пептиды

4.2.1. Введение

Пептидами называют продукты ковалентного связывания двух и более аминокислот, имеющие следующую общую формулу:



Верхний предел величины пептидов остается неопределенным, так как некоторые продукты расщепления белков, тради-

ционно называемые пептидами, могут быть больше самых маленьких природных белков. В практической работе можно ориентироваться на верхний предел, равный 100 аминокислотным остаткам. Более крупные молекулы требуют методологического подхода, обычно используемого для белков (разд. 4.3).

В ряде случаев пептиды представляют собой биологически очень важные соединения. Их происхождение может быть весьма разнообразным.

Большая часть исследованных пептидов относится к группе природных. Эти пептиды очень часто обладают биологической активностью и могут участвовать в самых различных биохимических реакциях и выполнять другие функции. Они обычно участвуют в регуляторных процессах, выполняя функции гормонов или кофакторов ферментов. Большое число пептидов образуется в качестве продуктов распада в процессе биологического метаболизма белков. Выделение пептидов из биологических проб сопряжено со значительными трудностями, обусловленными тем, что пептиды, как правило, входят в состав сложных смесей с другими пептидами, белками, аминокислотами и многочисленными соединениями непептидной природы, в которых целевой пептид содержится в очень малых количествах.

Вероятно, поэтому большая часть изученных пептидов представляет собой продукты, образующиеся в процессе установления структуры и изучения крупных белков. Обычно белковую цепь необходимо разделить химическими или ферментативными методами на небольшие фрагменты, удобные для дальнейшего структурного анализа. Число методов избирательного и количественного расщепления, которые дают несколько строго определенных фрагментов, ограничено. Чаще всего приходится работать со сложной смесью пептидов, из которой очень трудно выделить целевой пептид в достаточно чистом виде и в необходимом для установления аминокислотной последовательности количестве. Задача установления структуры еще более усложняется в тех случаях, если в пробе содержатся лишь небольшие количества белков, представляющих интерес для исследователя.

Другой тип пептидов, представляющих интерес для биохимиков, — это синтетические аналоги и производные природных пептидов. Их удобно использовать для изучения зависимости структуры и функций, они могут также представлять определенный фармацевтический интерес. В пептидном синтезе целевой продукт, как правило, загрязнен пептидами с весьма близкой аминокислотной последовательностью или конформацией, образующимися в результате неполного протекания реакций и рацемизации. Контроль чистоты всех промежуточных форм пептидов, образующихся в процессе синтеза, и очистка конеч-

ного продукта требуют очень точных аналитических методов.

Хотя происхождение пептидов может быть различным, проблемы, возникающие в процессе их выделения и очистки, чаще всего очень близки. Пептиды содержат как гидрофильные, так и гидрофобные остатки аминокислот. В общем случае их можно считать полярными водорастворимыми соединениями. Традиционное разделение пептидов выполняется при помощи большого числа хорошо отработанных методов, таких, как осаждение, гель-проникающая хроматография, распределение в противотоке, адсорбционная и аффинная хроматография, хроматография и электрофорез на бумаге и в тонком слое. Хотя эти хорошо себя зарекомендовавшие методы до сих пор часто и успешно используются, каждый из них имеет недостатки или ограничения, например низкую разрешающую способность, низкий выход продукта или большое время разделения.

В последние годы ВЭЖХ становится все более важным методом очистки и даже идентификации пептидов. Очевидно, что ВЭЖХ постепенно вытесняет многие классические методы, особенно на последних стадиях очистки, поскольку ВЭЖХ превосходит старые методы по эффективности разделения, выходу продукта, скорости анализа и характеризуется низким пределом обнаружения. Иногда разрабатываются ВЭЖХ-варианты классических хроматографических методов. Однако часто выясняется, что ВЭЖХ действует как комбинация двух и более классических методов очистки. Это объясняется тем, что порядок разделения методом ВЭЖХ определяется одновременно несколькими различными свойствами пептидов, например и зарядом, и полярностью. Непревзойденная степень разделения, которая достигается при помощи ВЭЖХ, делает этот метод пригодным для контроля чистоты [70, 71], составления пептидных карт [72—87] или поисков генетических дефектов [83—86, 88, 89] в белках. В последнем случае хроматограмму трипсинового гидролизата аномального белка сравнивают с такой же хроматограммой соответствующего нормального белка и таким образом обнаруживают один или несколько отличающихся пептидов, т. е. проводят современный вариант анализа по методу «отпечатков пальцев». Пример ВЭЖХ-анализа генетически аномальных белков приведен на рис. 4.18. В данном случае сравниваются пептиды, образующиеся из аномального фибриногена под действием тромбина, которые отличаются всего на один аминокислотный остаток [89].

По ряду причин ВЭЖХ оказалась особенно важной для работы с малыми количествами пептидов. Так, для очистки требуется меньшее число стадий, и потери соответственно уменьшаются. Кроме того, можно применять неразрушающие методы обнаружения. Обычно используют высокочувствительное обнаружение по поглощению в УФ-области при 200—220 нм.

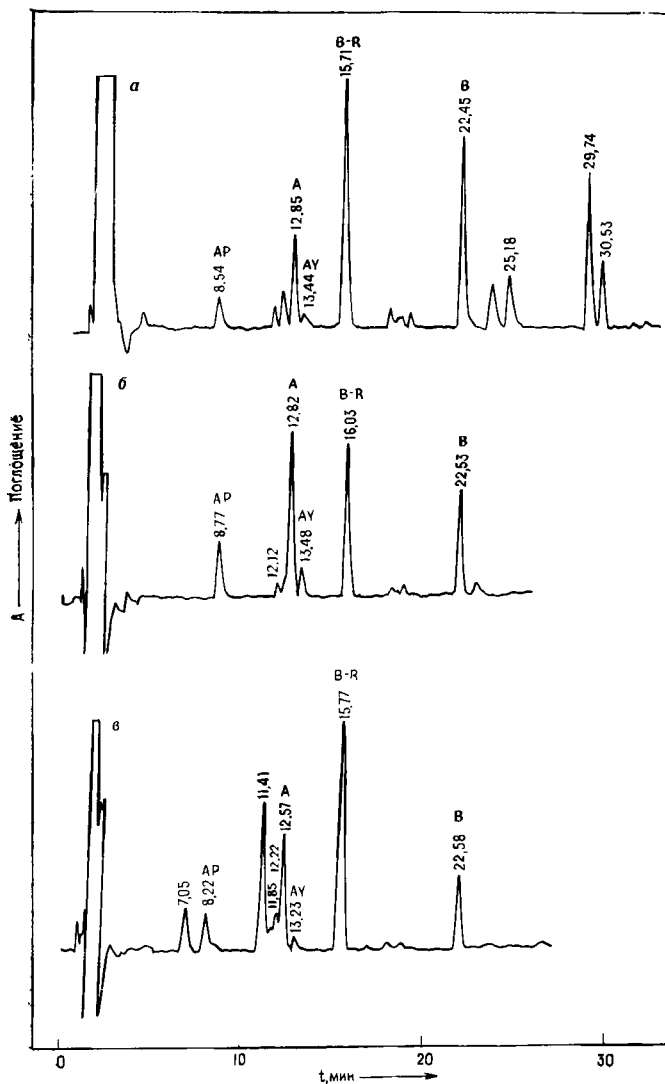


Рис. 4.18. Разделение методом обращенно-фазовой хроматографии фибринопептидов нормального и аномального фибриногенов человека, образующихся под действием тромбина [89].

а, в — аномальные фибриногены. Rouen (*а*) и Louisville (*в*); *б* — нормальный фибриноген. Неподвижная фаза: лихросорб RP-18; элюент: 0,025 M ацетат аммония (pH 6,0)/ацетонитрил, градиентное элюирование от 6 до 17% за 40 мин; температура: комнатная.

Тем не менее, если выбранная система растворителей делает обнаружение на малых длинах волн невозможным, аналогичной чувствительности можно добиться, прибегнув к постколоночной модификации элюируемых соединений нингидрином, флуорескаминоом или фталевым альдегидом, хотя при этом часть образца пептида теряется в процессе анализа. Возможность сбора фракций, содержащих образцы пептидов в малом объеме летучих растворителей, — еще одно преимущество ВЭЖХ как метода изучения и анализа микроколичеств пептидов.

Заслуживает внимания также следующее соображение: скорость разделения, которая может быть достигнута при помощи ВЭЖХ, играет важную роль в том случае, если существует опасность разрушения пептидов в процессе хроматографирования. Компоненты растворителя, такие, как кислоты или мочевины, могут в значительной степени модифицировать пептиды, что приведет к потере биологической активности, увеличить гетерогенность пептидной смеси, уменьшить выход целевого пептида и в итоге повлиять на интерпретацию результатов.

Число публикаций, посвященных разделению пептидов и белков методом ВЭЖХ, производит огромное впечатление, хотя эта методика появилась сравнительно недавно. Ввиду огромного числа пептидов и белков, неподвижных и подвижных фаз, методов обнаружения и других факторов, учитываемых в процессе разделения и очистки, мы приведем таблицу, в которой перечислим пептиды и белки, исследованные методом ВЭЖХ (табл. 4.3). Эта таблица поможет читателю получить представление о том, как обстоят дела в этой области в настоящее время. Большое число примеров использования различных принципов разделения и особенно полученных при этом результатов будут приведены в последующей части раздела.

4.2.2. Немодифицированные пептиды

Большая часть методов разделения, описанных в литературе, относится к разделению немодифицированных пептидов. В этих целях используются два типа неподвижных фаз — ионообменные и обращенно-фазовые. Число публикаций, описывающих разделение пептидов последним методом, значительно больше.

4.2.2.1. Обращенно-фазовая хроматография. Обращенно-фазовая ВЭЖХ — предпочтительный метод разделения пептидных смесей. В принципе немодифицированные пептиды вследствие их высокой полярности должны очень плохо поддаваться разделению этим методом. Пептиды не способны в достаточной степени связаться с гидрофобной поверхностью неподвижной фазы, более того, они довольно прочно связываются со свобод-

Таблица 4.3. Пептиды и белки, разделявшиеся методом ВЭЖХ

Пептид/белок	Литература
N-Ацетилированные-перметири- ванные пептиды	167
Ацетилхолинэстераза	390
α -1-Кислый гликопротеин	280, 323
Кислые белки из минерализованных тканей	369
Родственные АКГ пептиды	93, 94, 96, 97, 104, 106, 109, 111, 112, 114, 118, 120, 123, 148, 180, 183, 195, 199, 208, 234, 301, 371, 378, 399
Актинидин	72
Ацилпереносящий белок	72, 105
Белок, закодированный в аденови- русе	253
Аденилосукцинат-синтетаза	298
Альбумин	87, 143, 212, 234, 239, 242, 245, 247, 252, 257, 263, 270, 277, 278, 280, 283, 290, 293, 301, 306, 307, 309, 315, 317, 320, 321, 327, 329, 330, 332, 336, 341, 346—348, 351— 353, 356—358, 360, 362—364, 368, 370, 389—391, 400, 401, 403, 404, 406, 416
Алкогольдегидрогеназа	143, 290, 364
Альдегид-дегидрогеназа	305, 345, 364, 369
Альдолаза	239, 301, 306, 313, 327, 351, 358, 362, 363, 370
Аллергены	308
Оксидаза D-аминокислот	337
Аминопептидаза из <i>Aeromonas pro- teolytica</i>	137
Амилаза	277, 323, 394
Амилотрипсиногеназа	358
Амилоидные белки	82, 159
Ангиотенсин	4, 70, 90, 91, 93, 96, 101, 103, 114, 129, 145, 148, 152, 180, 199, 301, 378 218, 264, 356
Антигены, связанные со стенкой кле- ток опухоли типа 1a	76, 115, 207, 218, 223, 256, 279, 323
Аполипопротеин	148, 327, 353, 371, 407
Апротинин	291
Арилсульфатаза	353
Авидин	188, 330, 333, 334
Бактериородопсин	128, 154, 159
Белок Бенса Джонса	93, 96, 105, 106
Бомбезин	90, 91, 114, 148, 199, 263
Брадикинин	
Белки мозга	155, 159
S 100	159
14-3-2	90, 91
Церулеин	255
Кальциневрин	93, 96, 118, 122, 227, 376
Кальцитонин	73, 78, 255, 260
Кальцийсвязывающий белок	158, 159, 255
Калмодулин	

Пептид/белок	Литература
Карбоангидраза	143, 257, 281, 329, 360, 370, 401, 407, 409
Карбоксипептидаза	323
Казеин	75, 307
β -Казоморфин	148, 300
Каталаза	239, 301, 306, 313, 327, 329, 351, 353, 362
Целлюлаза	292
Холецитокинин	91
Химотрипсин (оген)	148, 239, 263, 270, 277, 283, 301, 306, 309, 313, 317, 320, 321, 327, 329, 346, 351, 353, 358, 362, 363, 391, 404, 411
Хорионический гонадотропный гормон	308
Клупеин	321
Коллаген	98, 142, 156, 244, 247, 252, 254, 416
Кональбумин	401
Кортикотропина рилизинг-фактор	121, 176, 181, 189, 398
Креатинкиназа	143, 197, 273, 274, 288, 289
Креатинфосфокиназа	270, 271, 290
Кросс-реактивный белок	140
Цитохром b 5	205, 207
Цитохром b 561	344
Цитохром c	91, 93, 109, 118, 143, 148, 234, 238, 239, 245, 247, 252, 277, 282, 301, 307, 313, 315, 317, 320, 327, 329, 330, 346, 348, 351—354, 357, 358, 363, 370, 380, 390, 391, 401, 403, 404, 407
Цитохром P 450	205, 238, 294
DAVTC-пептиды	165
Дансифирированные пептиды	166
Дельта-пептид сна	91
Дерморфин	217, 299
ДНК-связывающий белок	79
Динорфин	91, 216
Эледозин	90, 91, 114, 157
Фактор элонгации Т _и	108
Фактор, индуцированный беременностью	360
Энцефалитогенные пептиды	221
Эндорфин	90, 94, 96, 97, 103, 105, 106, 109, 112, 114, 118—120, 127, 130, 133, 134, 140, 145, 148, 149, 171, 179, 180, 182, 183, 186, 190, 199, 202, 211, 212, 215, 227, 235, 236
Энкефалин	90, 91, 93, 96, 97, 103, 105, 112, 114, 118, 122, 123, 127, 130, 133, 134, 144, 148, 153, 198, 199, 203, 212, 216, 219, 227, 234—236, 243, 376
Эрабутоксин	321
Фелипрессин	95, 175
Ферритин	148, 266, 301, 306, 313, 317, 351—353, 357, 358, 362, 370, 400, 403

Пептид/белок	Литература
Фетуин	323
Фибриноген	246, 309, 315, 325, 346, 408
Фибринопептид	89, 100, 187, 226
Фибронектин	126, 238
Фолликулостимулирующий гормон	157, 308
β -Галактозидаза	268, 303, 363, 370
Гастрин	93, 96
Глюканаза	292
Глюкозооксидаза	284, 411
Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа	306
Глюкуронидаза	363
Глюкагон	90, 91, 93, 96, 101, 105, 148, 176, 180, 190, 222, 320, 378
ϵ -(γ -Глутамил)лизин	412
Гликопротеин	
внешняя оболочка <i>Trypanosoma rhodiense</i>	81
гематоглинин вируса гриппа А	229
Гормон роста	145, 186, 221, 260, 301, 308
Гемоцианин	233
Гемоглобин	74, 83—86, 88, 131, 132, 135, 137, 191, 221, 240, 241, 249, 257, 259, 270, 271, 275, 276, 278, 280, 286, 295, 301, 315, 343, 346, 363, 370, 374, 379, 384, 387, 388, 400, 403, 413, 418
Гексокиназа	306
Компонент 0,62 с высоким содержанием тирозина из шерсти	391
Гистон	261, 321
Гомокарнозин	212
Гиалуронидаза	353
Имуноглобулин	124, 166, 218, 280, 306, 307, 309, 315, 317, 321, 323, 329, 346, 348, 360, 363, 403
Инсулин	93, 96, 101, 103, 105, 109, 118, 120, 145, 148, 176, 189, 190, 212, 221, 224, 239, 242, 243, 245, 263, 281, 283, 301, 313, 320, 321, 327, 329, 356, 371, 378, 391, 397
Интерферон	251, 253, 262, 397
Изоцитратдегидрогеназа	353
Лактальбумин	255, 307, 329
Лактатдегидрогеназа	270—273, 277, 287, 288, 290, 301, 315, 329, 364, 367, 417, 418
β -Лактоглобулин	257, 281, 301, 307, 313, 327, 329, 332, 348, 353, 363, 401, 403, 416
Лас-репрессор	341
Лейцинаминопептидаза	363
Липоамид-дегидрогеназа	337
Липопотеин	318, 319, 336, 348—350, 392
β -Липотропин	93, 96, 97, 111, 112, 123, 127, 149, 171, 182, 192, 208
Липоксигеназа	402
Лютеинизирующий гормон	308

Пептид/белок	Литература
Лютеинизирующего гормона рнли- зинг-фактор Лизопрессин Лизоцим	90, 91, 109, 123, 148, 180, 189, 216 95, 103, 175 87, 93, 124, 131, 143, 145, 242, 243, 257, 277, 283, 301, 313, 327, 329, 362, 363, 370, 372, 389, 401, 404
Малатдегидрогеназа α -Меланотропин Меллитин Мембранные белки Белки молока Протенназа плесневых грибов Металлотнонен Мононуклеарный клеточный фактор Мотилин Муцин Антиген к мурену IA Основной белок мнелиновых оболо- чек Многоглобин	143 4, 90, 93, 96, 120, 180, 199 93, 96, 407 80, 330, 331, 333, 334, 406 306, 307 285 260, 311, 342 355 122 357 218, 264 87, 109, 375
Мнозин Нейропептид Y Нейрофизин Нейротензин Нейротоксин Овальбумин	87, 93, 143, 234, 270, 290, 301, 309, 313, 315, 317, 327, 346, 347, 352, 353, 357, 358, 363, 370, 391, 401, 403 306, 310, 391 138 171, 193, 258, 377, 382, 383 90, 91, 93, 96, 106, 148, 180, 396 170
Овоингибитор Овомуконд Орнипрессин Орозомуконд Окситоцин	87, 140, 143, 148, 239, 242, 243, 245, 263, 277, 278, 301, 306, 307, 309, 313, 315, 317, 320, 321, 323, 327, 329, 332, 346, 351, 353, 358, 363, 370, 389, 391, 401, 403, 404, 409, 415 323 323 95, 173, 175 357
Гормон парашитовидной железы Парвальбумин Пепсин Пероксидаза Гликопептид слизи Щелочная фосфатаза 3-Фосфоглицераткиназа Фосфорилаза Фосфорилированные пептиды Физалаемин Пептиды вируса полиомелита Преальбумин Протилгидроксилаза Проопиокортин Защищенные пептиды Ингибитор α 1-протенназы Ингибитор протеиназы A	90, 91, 93—96, 100, 103, 105, 148, 151, 152, 157, 161, 163, 173, 175, 190, 200, 203, 301, 371 152 143, 255 307, 313, 315, 327, 353, 363 346, 353, 411 220 270, 290, 143 321, 329, 370, 416 232 90, 157 401 280 140 195, 214 170, 410 366 113

Пептид/белок	Литература
Протеинкиназа, кАМР-зависимая	107
Протромбин	414
Раватенсин	91, 105
Рибонуклеаза (РНКаза)	4, 93, 139, 155, 242, 243, 245, 252, 263, 277, 313, 320, 321, 323, 329, 346, 352, 357, 360, 363, 370, 401, 403, 404, 407, 409
РНК-полимераза	321
Секретин	122, 222, 305
Белки плазмы крови	271, 280, 293, 302, 306, 309, 314, 336, 338, 400, 403, 414, 418
Соматостатин	90, 91, 93, 96, 103, 105, 106, 109, 114, 118, 120, 123, 148, 176, 180, 185, 194, 196, 206, 212, 216
Белки сои	263
Вещество Р	18, 91, 93, 96, 99, 103, 106, 114, 122, 123, 148, 152, 216, 219, 234, 376
Сиаактеи	96, 97, 118, 120, 176, 181
Синтетические пептиды	70, 71, 100, 116, 120, 130, 157, 160, 164, 169, 172, 174, 184, 199, 211, 221, 234, 237, 378
Тиаминсвязывающий белок	386
Тимопозтин	116, 148
Тиреоглобулин	145, 184, 301, 317, 348, 351, 356, 358, 400, 403
Тиреоидный связывающий белок	301, 306
Тиреотропин	145, 184, 301
Тиреотропин релизинг-фактор	90, 91, 114, 123, 157, 164, 212, 216, 219
Фактор переноса, человеческий	385
Трансферрин	280, 309, 313, 323, 336, 363, 406
Триозофосфатизомераза	230
Тропомозин	391
Тропонин с	255
Трипсиноген	265, 270, 290, 301, 313, 353, 363, 389, 411
Ингибитор трипсина	137, 143, 270, 306, 313, 320, 321, 329, 356, 359, 360, 401, 403, 407, 411
Тубулин	326
Тубулин-тирозинлигаза	393
Тафцин	90, 91, 148
Фактор роста опухолевых клеток	125, 281
Тирозиназа	247
Уреаза	303, 403
Белки мочи	291, 317, 318
Урокиназа	304, 339
Уротенсин	108
Вазоактивные белки кишечника	91, 106, 122
Вазопрессин	18, 91, 93, 94, 96, 148, 151, 152, 173, 190, 199, 205, 212, 356
Вазотоцин	91, 96, 148, 151
Вирусные белки	80, 229, 242, 243, 253, 305, 401

ными остаточными силанольными группами. Для того чтобы исключить эти нежелательные эффекты, следует, во-первых, подавить взаимодействие со свободными силанольными группами и, во-вторых, подбирать условия разделения таким образом, чтобы уменьшить полярность пептидных молекул. Влияние свободных силанольных групп можно уменьшить путем добавления в элюент солей или сильных кислот. Концентрация буферного раствора должна быть порядка 0,1 М. Для уменьшения полярности пептидов хроматографирование следует проводить при низких значениях pH (ниже 3,0), так как при этом карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот, содержащиеся в их боковых цепях, практически не диссоциируют. Однако при этих значениях pH боковые цепи остатков аргинина, лизина и гистидина заряжены. Поэтому анион буфера следует выбирать таким образом, чтобы он был способен образовывать ионную пару с основными группами боковых цепей. Если следовать этим принципам, то ВЭЖХ окажется необычайно гибким способом исследования благодаря высокой селективности при выделении и очистке пептидов.

Для ряда условий разделения время удерживания пептидов, имеющих меньше 25 аминокислотных остатков, можно с определенной достоверностью предсказать, исходя из их аминокислотного состава [90—94]. Удерживание пептида можно рассматривать как сумму вкладов составляющих его аминокислот. Аминокислоты с ароматической или большой алифатической боковой цепью вносят основной положительный вклад в удерживание, аминокислоты с кислотной боковой цепью — основной отрицательный вклад, а те из аминокислот, которые имеют основную или маленькую нейтральную боковую цепь, оказывают лишь малое отрицательное воздействие. Однако следует помнить, что изомеры пептидов, время удерживания которых должно быть предположительно одинаковым, в действительности элюируются раздельно. Для пептидов, содержащих более 25 аминокислотных остатков, влияние конформации делает предсказания еще менее достоверными.

Если ориентироваться на литературные данные, то за последние несколько лет ряд определенных систем растворителей для обращенно-фазовой хроматографии пептидов стал доминирующим. Если разделение проводят в аналитических целях, т. е. если необходимы хроматограммы с хорошо разрешенными острыми пиками, элюирование чаще всего проводят 0,1%-ной фосфорной кислотой или фосфатными буферами, подкисленными до pH 2—3 фосфорной или хлорной кислотой [4, 70, 72—79, 95—108]. Протонированные аминокислотные группы пептидов, вероятно, способны образовывать гидрофильные ионные пары с остатками фосфорной кислоты, что приводит к снижению сродства пептида к неподвижной фазе. Если элюирование ведется фос-

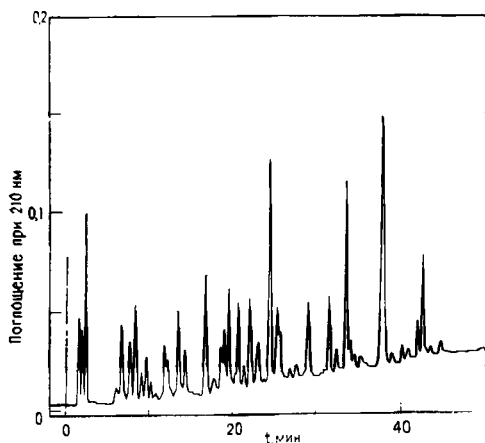


Рис. 4.19. Разделение трипсинового гидролизата Са-связывающего белка цыплят (30 мкг) методом обращенно-фазовой хроматографии [78].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: 0,1%-ная фосфорная кислота/ацетонитрил, градиентное элюирование: от 0 до 70% ацетонитрила за 1 ч; температура: комнатная.

фатными буферами, можно применять неразрушающее обнаружение по поглощению в УФ-области вблизи 200 нм, где любой пептид можно обнаружить даже в очень малых концентрациях, поскольку пептидные связи поглощают в этой области. Буферные растворы данного типа применяются в очень многих областях, и время удерживания пептидов с известным аминокислотным составом или последовательностью можно предсказать достаточно точно [90—92]. Благодаря хорошему разрешению, достигаемому при элюировании фосфатными буферами, эти системы очень удобны для идентификации пептидов, контроля их чистоты и для создания пептидных карт (рис. 4.19). Недостаток фосфатного буфера — его нелетучесть.

Триэтиламинофосфатные буферы, впервые предложенные Ривьером и др. [109], находят все более широкое применение [80, 110—112]. У этих буферов pH лежит в интервале от 2,2 до 6,5. При их использовании пики на хроматограмме имеют хорошую форму, вероятно, вследствие эффекта маскирования остаточных доступных силанольных групп неподвижной фазы и ион-парного взаимодействия с пептидом. Обнаружение в этом случае можно проводить по поглощению в УФ-области при 200—220 нм. Выход разделяемых пептидов достаточно высок, а их биологическая активность, как правило, сохраняется.

Для препаративного разделения широко применяется предложенная Беннетом и др. [117, 118] система растворителей на основе 0,1%-ной трифторуксусной кислоты [71, 81, 82, 93, 94, 108, 119—126]. Пример использования такой системы показан на рис. 4.20.

Разбавленный раствор трифторуксусной кислоты, входящий в состав элюента, летуч и прозрачен в УФ-области до 205 нм. Его pH равен 2,2, а концентрация 0,013 моль/л, т. е. она ниже,

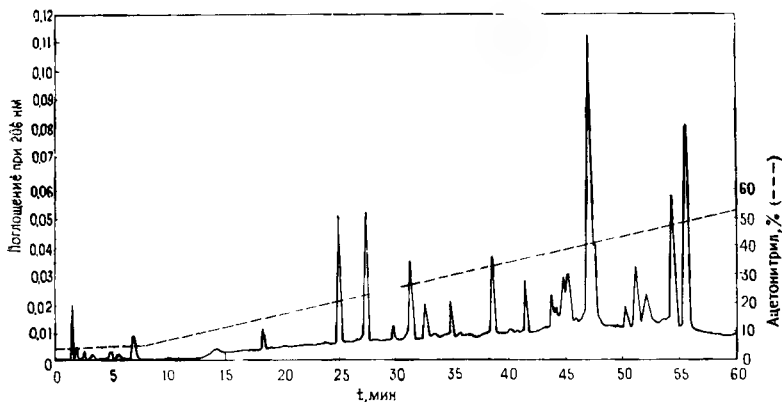


Рис. 4.20. Разделение трипсинового гидролизата амилоидного компонента Р плазмы методом обращенно-фазовой хроматографии [82].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: 0,1%-ная трифторуксусная кислота/ацетонитрил.

чем в фосфатной системе, однако последняя дает пики лучшей формы. В то же время пептиды, особенно крупные, как правило, лучше растворяются в трифторуксусной кислоте, что увеличивает их выход. Времена удерживания в этой системе пептидов с известной аминокислотной последовательностью также можно предсказывать [93, 94].

Другие перфторкарбоновые кислоты имеют те же преимущества, что и трифторуксусная кислота, но проявляют иную селективность вследствие различия в размере и гидрофобности перфторалкильных групп. Это делает их весьма удобными для проведения повторного хроматографирования. Однако высшие перфторкарбоновые кислоты, как правило, трудно получать необходимой степени чистоты [118].

Еще один полезный компонент буферных растворов для хроматографии пептидов — ацетат аммония [83—86, 88, 89, 127—130]. На рис. 4.21 приведен пример разделения с буфером этого типа. Ацетат аммония достаточно летуч, и его можно использовать в такой же высокой концентрации, как и фосфатные буферы. Его нормальный рабочий диапазон pH от 4,0 до 6,0, т. е. это менее кислый буфер. Форма пиков, получаемых при элюировании указанным буфером, не столь хороша, как при элюировании фосфатным буфером. Из-за интенсивного поглощения ацетатом в УФ-области при обнаружении при длинах волн меньше 210 нм могут возникать трудности.

Некоторые авторы пользуются буферной системой на основе разбавленной соляной кислоты [131, 132]. Хотя этот буфер абсолютно прозрачен в УФ-области и его успешно применяли

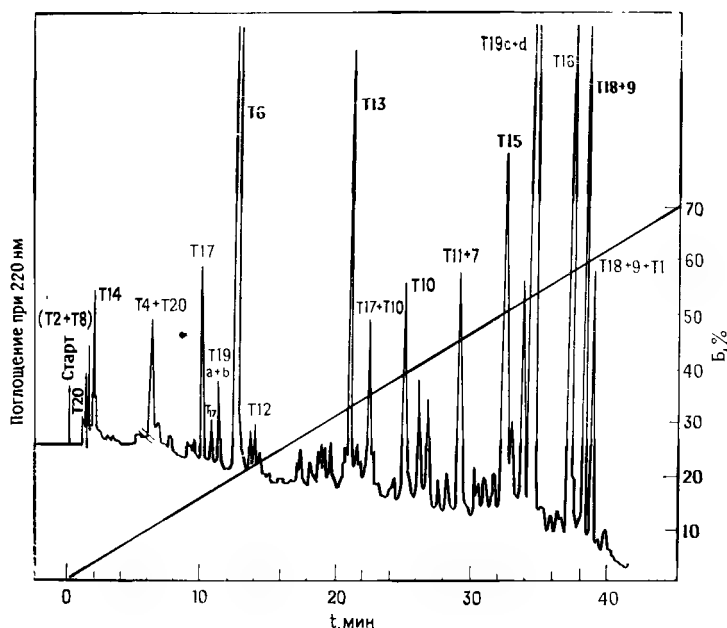


Рис. 4.21. Разделение трипсинного гидролизата белка Бенса Джоиса методом обращенно-фазовой хроматографии [128].

Неподвижная фаза: зорбакс С₈; элюент: А — 0,05 М ацетат аммония, pH 6,0, Б — 0,05 М ацетат аммония, pH 6,0/60%-ный ацетонитрил, градиентное элюирование; температура: 60 °С.

в ряде работ, его следует все же избегать, так как он корродирует даже нержавеющую сталь.

Ацетат и формат пиридина — хорошие растворители для пептидов, что давно известно из классической ионообменной хроматографии. Эти буферы пригодны также для обращенно-фазовой ВЭЖХ. К сожалению, у них имеется существенный недостаток: они сильно поглощают в УФ-области, что делает невозможным обнаружение пептидов по поглощению в УФ-области. В этой ситуации приходится пользоваться реакционными детекторами [87, 133—138].

Элюирование пептидов с обращенных фаз, как правило, проводится в градиентном режиме с добавлением органического модификатора. Поскольку удерживание пептидов в основном обеспечивается гидрофобным взаимодействием, время удерживания должно уменьшаться с повышением концентрации органического модификатора в элюенте. Это, однако, справедливо только для концентраций органического модификатора, не превышающих 40% [101, 102, 105]. При более высоких концентрациях органического растворителя удерживание неподвижной

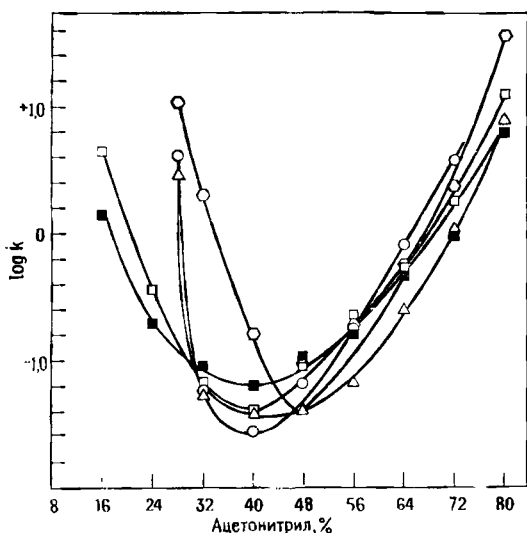


Рис. 4.22. График зависимости $\log k$ от содержания ацетонитрила для ряда пептидных гормонов [101].

Неподвижная фаза: μ -бондапак S_{18} ; элюент: 0,015 М буферный раствор фосфата триэтиламина; гормоны: глюкагон, инсулин, В-цепь инсулина, ангиотензин I, ангиотензин II.

фазой растет, как это показано на рис. 4.22. Возможно, что это происходит из-за смены механизма разделения: обращенно-фазовый механизм разделения сменяется полярно-фазовым. Считается, что такое поведение является следствием возникновения различных конкурентных сорбционных механизмов [101, 102, 105]. При низких концентрациях органического растворителя преобладает адсорбция, обусловленная гидрофобным взаимодействием, что и определяет порядок элюирования, обычно наблюдаемый в обращенно-фазовой хроматографии. При более высоких концентрациях органического модификатора остаточные свободные силанольные группы, которые присутствуют вследствие неполной модификации поверхности неподвижной фазы на основе силикагеля, повышают силанофильное ионное взаимодействие между заряженными группами пептидов и поверхностью неподвижной фазы.

Кривая, приведенная на рис. 4.22, предполагает динамическую перестройку межповерхностного слоя между гидрофобной поверхностью неподвижной фазы и подвижной фазой, что приводит к более сильному взаимодействию пептида с полярными группами на поверхности неподвижной фазы. Вид кривой, характеризующей зависимость времени удерживания от содержания органического модификатора в подвижной фазе, индивидуален для каждого пептида, и для более крупных пептидов и белков эта кривая более крутая. Таким образом, для пептидов и белков оптимальное элюирование может быть достигнуто только в сравнительно узком диапазоне концентраций органического модификатора. Этим объясняется тот факт, что при

разделении пептидов и белков градиентное элюирование, как правило, дает лучшие результаты, чем изократическое, и что пептиды элюируются узкими пиками. Однако в связи с вышеизложенным следует отметить, что концентрация органического растворителя влияет на растворимость и конформацию пептидов, а изменение конформации может повлиять на взаимодействие пептид — неподвижная фаза. Очевидно, что неверный выбор условий градиентного элюирования может привести к потерям или плохому разделению пептидных компонентов. На практике рекомендуется использовать очень пологие линейные градиенты (изменение концентрации органического растворителя не больше 1% в минуту) и избегать высоких концентраций органического модификатора. Следует обратить особое внимание на то, чтобы при выбранной концентрации органический модификатор не вызывал выпадения в осадок солей буфера.

Наиболее распространенный органический модификатор — ацетонитрил. Он прозрачен в УФ-области до 200 нм и характеризуется хорошей селективностью. Это лучший органический модификатор при разделении пептидов, но при разделении гидрофобных белков, которые элюируются только при высокой концентрации ацетонитрила, следует помнить, что белки могут выпасть в осадок и, следовательно, быть потеряны.

В ряде случаев в качестве органического модификатора используют изопропанол и *n*-пропанол, которые отличаются большей элюирующей способностью по сравнению с ацетонитрилом [139, 140]. Хотя форма пиков и разрешение в этом случае хуже, элюирование достигается при более низких концентрациях органического модификатора, чем при введении в элюент ацетонитрила или метанола. Поскольку пропанол интенсивно поглощает при длинах волн меньше 230 нм, обнаружение пептидов следует проводить на 280 нм (при этой длине волны поглощают пептиды, содержащие тирозин и триптофан) или использовать для обнаружения химическую реакцию.

Путем соответствующего выбора неподвижной фазы также можно менять селективность и разрешение при разделении. На гидрофобность поверхности неподвижной фазы влияют: тип силикагеля, размер пор, размер частиц, содержание углерода, тип введенного заместителя и степень замещения.

Наибольшее распространение получили обращенные фазы с углеродными цепями C_{18} и C_8 . В общем случае с увеличением гидрофобности неподвижной фазы эффективность разделения возрастает, но при этом существует опасность потери части пептидов. Цианопропильные неподвижные фазы более полярны, чем фазы C_{18} или C_8 , и поэтому более пригодны для разделения очень гидрофобных пептидов. Некоторые широко используемые неподвижные фазы и их свойства приведены в обзоре [141].

Для крупных пептидов (мол. масса свыше 4000) разделение на обращенных фазах с большим размером пор (300 Å) дает лучшие результаты, чем разделение на обычных обращенных фазах с размером пор от 60 до 100 Å [142, 143].

Помимо неподвижной фазы и элюента на разделение пептидов влияет еще ряд параметров.

Оптимальная объемная скорость должна составлять от 1 до 2 мл/мин.

Влияние температуры подробно не исследовано, но складывается впечатление, что повышение температуры не дает ощутимых преимуществ. Зависимость времени удерживания от температуры минимальна.

Очень важно начинать работы по разделению методом ВЭЖХ с проведения холостого опыта, т. е. градиентного элюирования без ввода пробы. Как правило, на колонке содержится большое количество соединений, поглощающих в УФ-области, которые могут элюироваться даже спустя несколько часов после окончания предыдущего разделения. Более того, часто на хроматограммах появляются ложные пики — это элюируются загрязнения, содержащиеся в воде или органическом модификаторе.

Количество пептидов, которое можно наносить на обычную аналитическую колонку (250×4,6 мм), может достигать нескольких миллиграмм. Для разделения очень больших проб следует выбирать колонку с радиальным сжатием [144—146].

Объем растворителя, в котором растворяют пробу, должен быть минимальным. Можно наносить и большие объемы, но форма и разрешение пиков (особенно тех соединений, которые элюируются первыми) будут при этом ухудшаться.

Выход пептидов при обращенно-фазовой хроматографии, как правило, очень высокий и составляет 80—100% даже при разделении микрограммовых проб. Однако он зависит от природы каждого конкретного пептида. Трудно связать размер получаемого пика с количеством пептида, если он неизвестен, так как и пептидные связи, и аминокислотные остатки, присутствующие в пептиде, вносят свой вклад в суммарное поглощение в УФ-области. УФ-спектры индивидуальных аминокислот приведены на рис. 4.23.

4.2.2.2. Ионообменная хроматография. ВЭЖХ-вариант ионообменной хроматографии как метод очистки пептидов в настоящее время находит весьма ограниченное применение. Вероятно, это связано с большей гибкостью обращенно-фазовой ВЭЖХ, т. е. потребность в использовании ионообменных методов до настоящего времени не возникала. Однако ионообменная ВЭЖХ имеет ряд преимуществ. Это, во-первых, 10- или даже 100-кратное увеличение емкости колонок при сохранении их размеров,

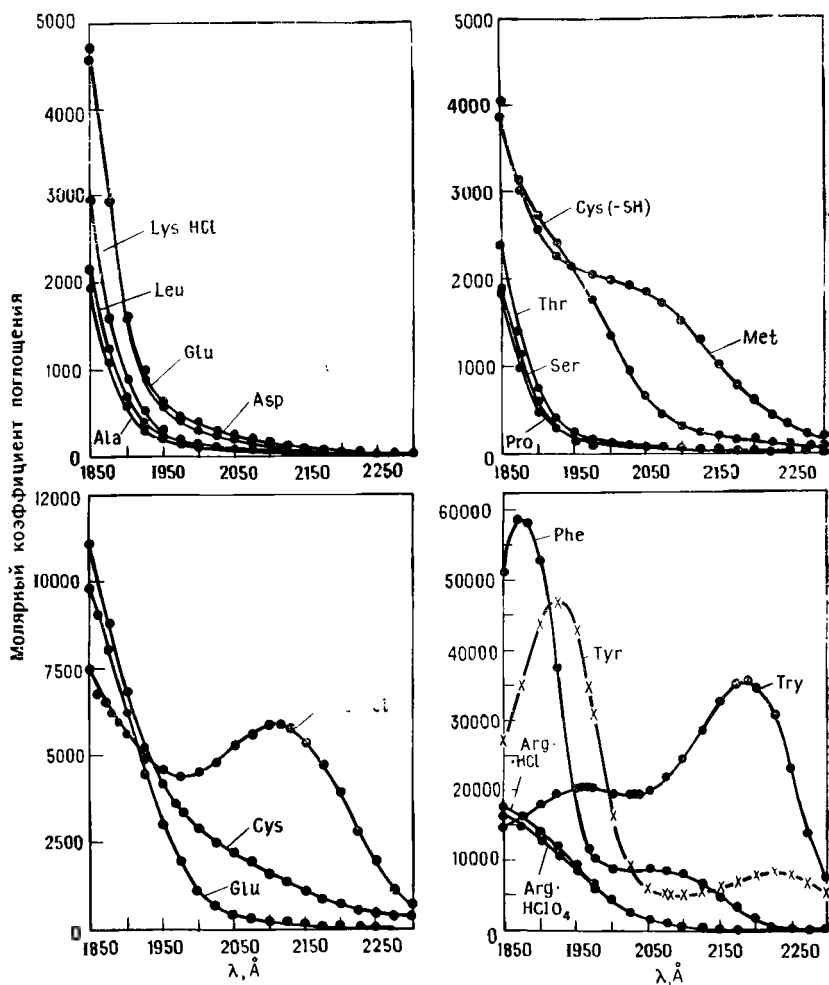


Рис. 4.23. УФ-спектры аминокислот [147].

и, во-вторых, возможность выполнять разделение при щелочных рН.

Обычно в качестве неподвижных фаз используются два типа материалов: на основе силикагеля и сшитого полистирола. В щелочной среде устойчив только последний материал. Большая часть описанных в литературе примеров применения этого метода относится к разделению маленьких пептидов с молекулярной массой меньше 2000. Некоторые варианты успешного разделения приведены в табл. 4.4. В верхней части таблицы

Таблица 4.4. Применение ионообменной хроматографии для разделения пептидов

Неподвижная фаза (форма частиц)	Элюент	Тем- пера- тура, °C	Обнаруживающий ре- агент или способ обнаружения	Соединение	Лите- ратура
Партисил SCX (сфери- ческая)	Ацетат пиридина	~20	Флуорескамии	Ангиотензин, легкие цепи иммуно- глобулинов, инсулин, Leu-энкефа- лин, паратиреоидный гормон, ок- ситоцин, вещество P, вазопрессин	148, 151, 152
	Ацетат пиридина	55	Флуорескамии	β-Липотропин	149
	Цитрат лития	50	Фталевый альдегид	His-содержащие дипептиды	150
Дюпон SCX (сфериче- ская)	Фосфат натрия	?	Электрохимический	Met-энкефалин	153
Хитахи-гель 3013 C (че- шуйчатая)	Аммиак/ацетонитрил/ изопропанол/метан- сульфокислота	70	УФ (210 нм)	Белки Бенса Джонса (составление пептидной карты)	154
DC-4A	Ацетат пиридина	52	Нингидрин	Рибонуклеаза А, белок мозга S 100	155
	Цитрат натрия	50—75	Нингидрин	Коллаген (составление пептидной карты)	156
DC-1A (чешуйчатая)	Ацетат пиридина	43	Нингидрин	Тиреотропин релизинг-фактор	157
Хитахи-гель 3013 N (че- шуйчатая)	Аммиак/ацетонитрил/ изопропанол/метан- сульфокислота	20	УФ (210 нм)	Калмодулин (составление пептидной карты)	158
Диайон CDR-10 (чешуй- чатая)	Аммиак/метансульфо- кислота/ацетонитрил/ изопропанол	22—70	УФ (210 нм)	Белок мозга 14—3—2, белок мозга S 100 b, калмодулин, белок Бенса Джонса (составление пептидных карт)	159
Микропак AX-10 (сфе- рическая)	Ацетат триэтилламмония/ ацетонитрил	40	УФ (220 нм)	Дипептиды	160

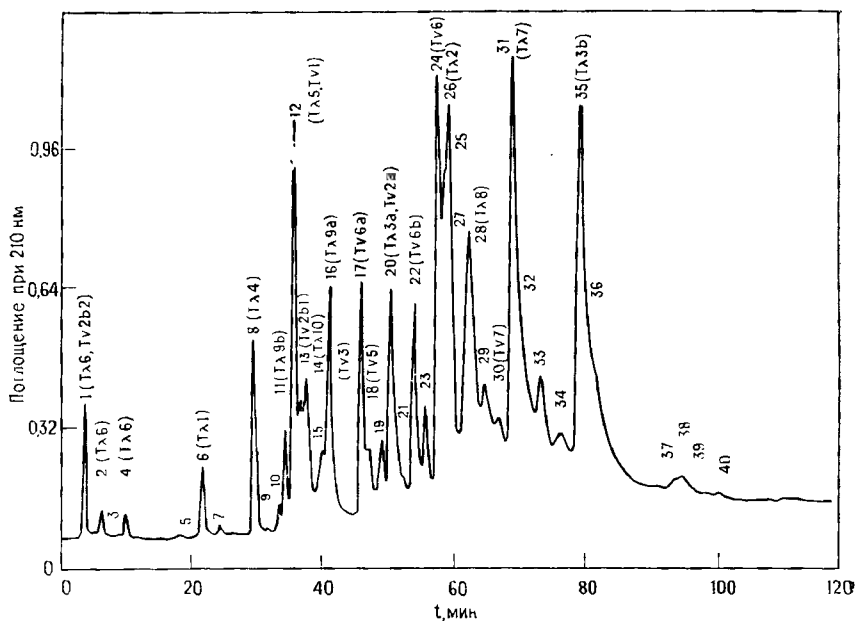


Рис. 4.24. Разделение трипсинового гидролизата белка Бенса Джонса (50 нмоль) методом ионообменной хроматографии [154].

Неподвижная фаза: хитачи-гель 3013 С; элюент: линейный градиент вода до 0,4 М аммиака, рН 6,2, установлено метансульфокислотой, 50%-ный ацетонитрил, 25%-ный изопропанол; температура: 70 °С.

содержатся данные по катионообменной, а в нижней части — по анионообменной хроматографии.

Кислые пептиды, как и следовало ожидать, лучше разделяются на анионообменниках, в то время как нейтральные и щелочные — на катионообменниках. Хроматограмма трипсинового гидролизата, полученная на колонке с катионообменной смолой на основе полистирола, приведена на рис. 4.24. Большинство используемых буферов поглощают в ближней УФ-области. Однако послеколоночная модификация с нингидрином и флуорескаминном позволяет улучшить обнаружение. Предел обнаружения составляет около 10 пмоль. Отдельные буферные растворы, допускающие обнаружение по поглощению в УФ-области, описаны в табл. 4.4. Большинство буферных систем содержит нелетучие компоненты, исключение составляет система, содержащая ацетат пиридина. Выход пептидов при разделении по этой методике составляет от 50 до 80%.

4.2.2.3. Разделение диастереомеров пептидов. Особой проблемой в хроматографии пептидов является разделение диа-

стереомеров пептидов, которые отличаются друг от друга только конформацией входящих в их состав остатков аминокислот. Природные пептиды, образующиеся при считывании нуклеотидной последовательности, состоят только из **L-аминокислот**, так как только эти кислоты кодируются генетически. Однако известно, что когда пептиды образуются по другим биологическим механизмам, в этом случае в их состав могут входить и **D-аминокислоты**. При проведении органического синтеза пептидов **D-аминокислоты** могут быть введены умышленно с целью модификации их свойств или случайно в результате рацемизации аминокислот в процессе синтеза.

Поскольку диастереомеры пептидов отличаются друг от друга по химическим, физическим и биологическим свойствам, их анализ и раздельное получение представляют собой важную задачу. До разработки методов ВЭЖХ этой цели достигали путем воздействия на **D-** и **L-**пептиды различными специфическими протеолитическими ферментами или оксидазами аминокислот либо путем модификации компонентов кислотных гидролизатов специальными энантиомерными реагентами (см. энантиомерные аминокислоты). В настоящее время диастереомеры можно эффективно разделять при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ на фазах C_{18} или CN [161—164] или методом ионообменной ВЭЖХ [160].

Подробное изучение разделения диастереомеров проведено на примере дипептидов. Так, при тщательном подборе подвижной фазы смесь **DL**-дипептидов можно разделить на два пика, один из которых соответствует **LL-** и **DD-**изомерам, а другой — **LD-** и **DL-**изомерам. Порядок элюирования этих пиков зависит от типа элюента и неподвижной фазы. В работах [161, 163] описано, в каких условиях удастся разделить многие из диастереомеров нонапептида окситоцина.

4.2.3. Модифицированные пептиды

В настоящее время опубликовано всего лишь несколько работ, в которых описано разделение модифицированных пептидов методом ВЭЖХ. Пептиды модифицируют по различным причинам: предколониная модификация позволяет увеличить чувствительность обнаружения, может предшествовать масс-спектрометрическому анализу и может проводиться в целях пептидного синтеза.

Модификация пептидов диметилазобензоллизотиоцианатом (ДАБИТЦ; ср. с модифицированными аминокислотами) была предложена [165, 166] с целью улучшения предела обнаружения пептидов и смещения длины волны, на которой проводится обнаружение, в область, свободную от влияния растворителя. Образующиеся ДАБТГ-производные пептидов можно разделять

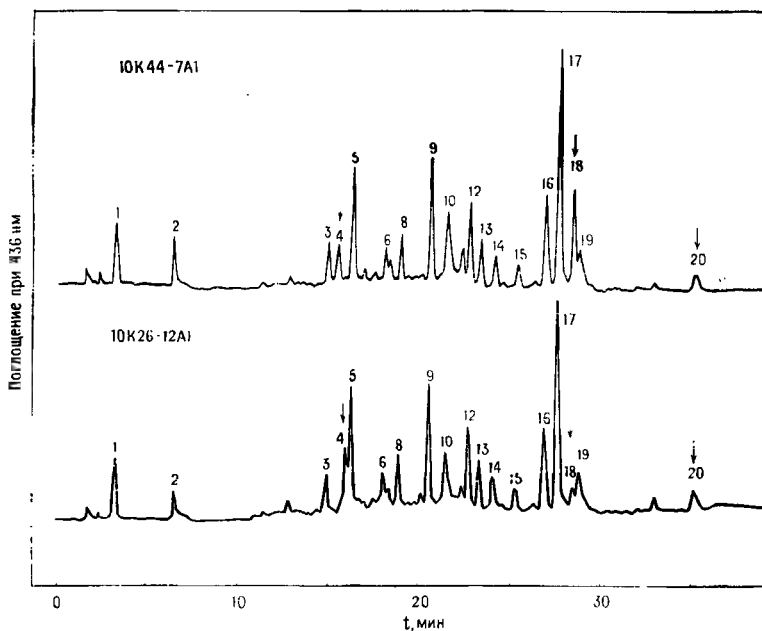


Рис. 4.25. Разделение ДАБТК-производных пептидов трипсинового гидролизата (20 пмоль) методом обращенно-фазовой хроматографии [166].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: градиент, 0,5%-ный пиридин, рН 7,0, установлено уксусной кислотой, 2%-ный диметилформамид, 0,005%-ный меркаптоэтанол, 10–80%-ный ацетонитрил за 40 мин; температура: 22 °С.

методом обращенно-фазовой хроматографии на фазах C_{18} , используя в качестве элюента смесь ацетата пиридина/диметилформамид/ацетонитрил. Отличные так называемые пептидные карты получаются даже для малых количеств (20 пмоль) смеси пептидов (рис. 4.25). Обнаружение осуществляется при длине волны 436 нм. Выход большинства пептидов был достаточно высок, и пептиды, содержащиеся в отдельных фракциях, полученных при разделении, можно сразу анализировать с целью выявления аминокислотной последовательности предпочтительно в виде ДАБИТЦ-производных.

Для определения аминокислотной последовательности методом прямой масс-спектрометрии чаще всего используются N-ацетилированные-перметилированные олигопептиды. Авторы работы [167] продемонстрировали возможность разделения этих производных пептидов на октисиликагелевой неподвижной фазе в системе для непрерывного ВЭЖХ-масс-спектрометрического анализа [167]. На начальной стадии этого эксперимента пептиды, содержащие от 2 до 5 аминокислотных остатков, разделяли в водно-ацетонитрильной системе.

В пептидном синтезе ВЭЖХ применялась для очистки и получения количественных характеристик пептидов с введенными защитными группами [168—170]. Пептиды с более чем 30 аминокислотными остатками, содержащие различные защитные группы, были разделены на колонках с различными силикагелевыми неподвижными фазами и фазой C_{18} .

4.3. Белки

4.3.1. Введение

Как уже отмечалось, принципиального различия между белками и крупными пептидами, т. е. содержащими более 100 аминокислотных остатков, не существует. Поэтому многие перечисленные выше факты, которые относились к пептидам, можно с успехом отнести и к белкам, и мы их повторять не будем, а обсудим некоторые специфические для ВЭЖХ белков аспекты. О «хроматографических свойствах» белков в условиях ВЭЖХ известно значительно меньше, чем о пептидах и аминокислотах. Вплоть до последнего времени разделение белков редко проходило успешно: и разрешение, и выход были гораздо хуже, чем при разделении пептидов, и обычно причиной этого был неправильный выбор неподвижной фазы и элюента.

Бóльшие трудности, с которыми приходится сталкиваться при разделении белков методом ВЭЖХ по сравнению с разделением пептидов низкой молекулярной массы, в значительной степени могут быть отнесены за счет различия в параметрах растворимости и иной значимости конформационных эффектов. Чем длиннее пептидная цепь, тем большее влияние оказывают вторичная и третичная структуры на такие свойства, как растворимость и поверхностная гидрофобность, что ведет к различиям в поведении по-разному свернутых, а также нативных и денатурированных форм белков. Разделение методом ВЭЖХ часто проводится в таких условиях, которые неблагоприятно воздействуют на растворимость природных белков или влияют на их конформацию. Так, экстремальные значения pH буфера и добавление к нему органических растворителей будут предположительно влиять и на растворимость белка, и на его конформацию. Увеличение концентрации органического модификатора и большая площадь контакта с поверхностью неподвижной фазы могут вызывать денатурацию белка в процессе его хроматографического разделения. Однако хорошо известно, что белки очень сильно различаются по чувствительности к денатурирующему воздействию и что некоторые из них способны восстанавливать исходную конформацию из денатурированного состояния. При проведении ВЭЖХ белков следует очень четко представлять себе цель работы, т. е. твердо знать, что необхо-

димо экспериментатору — биологически активный образец или материал для исследования химии белка. В первом случае следует подбирать такие условия, при которых нативная структура сохраняется или восстанавливается. Во втором случае можно выбирать из значительно большего диапазона условий разделения. Очень часто приходится проводить разделение белков в денатурированном состоянии, что иногда является также существенным преимуществом.

Белки можно разделять на колонках с различными неподвижными фазами. Разделение белков, как и пептидов, проводят на обращенных и ионообменных фазах. Гель-проникающая хроматография используется в основном для разделения белков. Разработан ВЭЖХ-вариант аффинной хроматографии белков.

Белки, разделяемые методом ВЭЖХ, перечислены совместно с пептидами в табл. 4.3.

4.3.2. Обращенно-фазовая хроматография

Первые попытки разделения белков методом ВЭЖХ проводились на тех же типах неподвижной фазы, которые применялись для разделения пептидов, т. е. на неподвижных фазах с химически привитыми октадецильными, цианопропильными или пропилфенильными группами с размером пор 100 Å и меньше. Авторы одной из первых публикаций на эту тему, появившейся в 1976 г., описали [239] успешное хроматографическое разделение высокомолекулярных белков, в том числе овальбумина (45 000), сывороточного альбумина (67 000) и каталазы (58 000), при градиентном элюировании системой фосфатный буфер (рН 2,0)/изопропанол с добавкой метоксизтанола (рис. 4.26).

Большинство исследований, в которых использовались неподвижные фазы с размером пор 100 Å, посвящены разделению белков малого и среднего размера, таких, например, как рибонуклеаза (14 000) и цепи гемоглобина (17 000) [139, 240—243]. Элюентом чаще всего служила система разбавленная трифторуксусная кислота/ацетонитрил. Разделение в системе этого типа представлено на рис. 4.27. Согласно данным работы [139], неподвижная обращенная фаза RP-8 больше подходит для разделения белков, чем обращенная фаза RP-18.

Основным достижением современной обращенной-фазовой ВЭЖХ как метода разделения белков является разработка неподвижных фаз с большим размером пор (больше 100 Å). Эти фазы обладают большей селективностью и обеспечивают больший выход продукта. Отличные хроматограммы получены рядом авторов [244—247] на неподвижной фазе видак TP на основе силикагеля с порами размером 330 Å. На этих колонках были разделены такие высокомолекулярные белки, как колла-

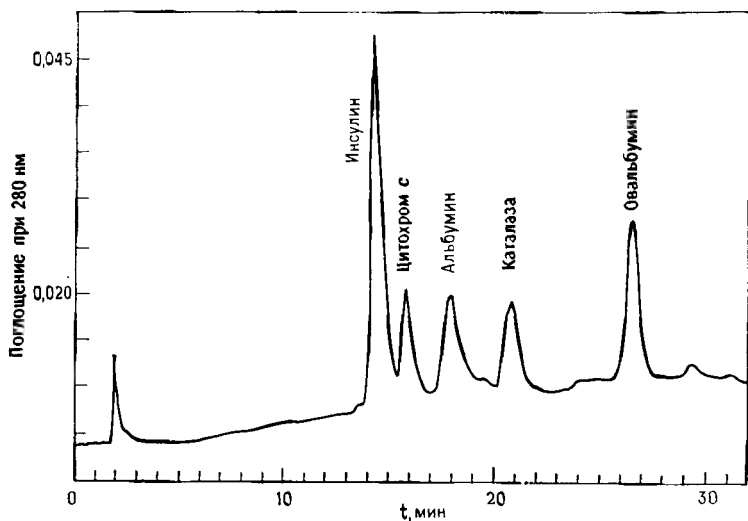


Рис. 4.26. Разделение белков методом обращенно-фазовой хроматографии [239].

Неподвижная фаза: нуклеосил ODS; элюент: градиент от 10 до 50% *Б* в *А*, *А* — 0,005 М двузамещенный фосфат калия/2-метоксизтанол (рН 2,0), установлено фосфорной кислотой, *Б* — изопропанол/2-метоксизтанол (рН 2,0), установлено фосфорной кислотой; температура: 47 °С.

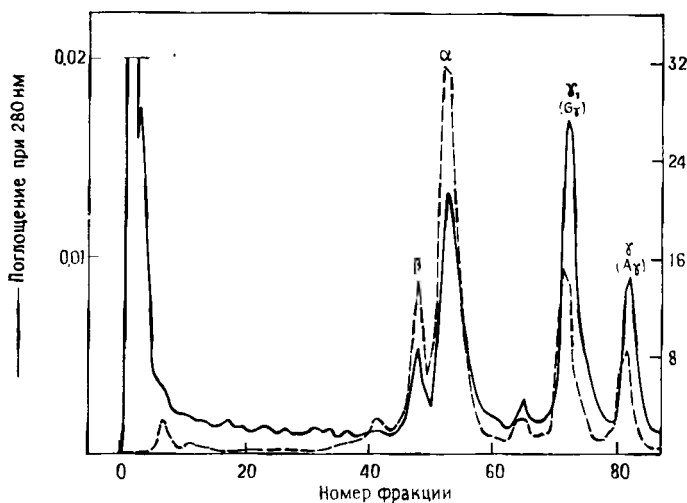


Рис. 4.27. Разделение цепей глобина (330 мкг) из крови (меченные [^3H]-лейцином) методом обращенно-фазовой хроматографии [240].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: 0,3%-ная трифторуксусная кислота/ацетонитрил, градиентное элюирование.

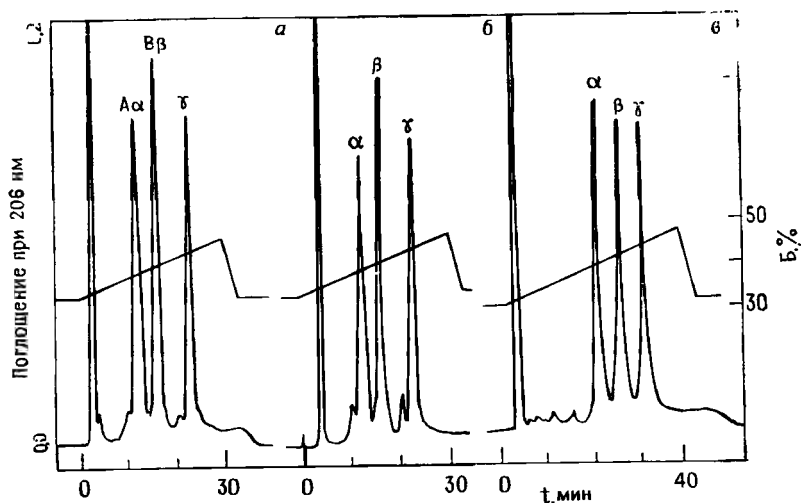


Рис. 4.28. Разделение S-карбоксиметилированного фибриногена (а), S-карбоксиметилированного фибрина (б) и меркаптилированных цепей фибрина (в) методом обращенно-фазовой хроматографии [246].

Неподвижная фаза: видак TP RP-10; элюент: 0,1%-ная трифторуксусная кислота/ацетонитрил, градиентное элюирование.

ген, фрагменты коллагена, сывороточный альбумин, овальбумин, цепи фибриногена; молекулярная масса большинства соединений составляла от 40 000 до 300 000. Работа [246] может служить примером такого разделения (рис. 4.28). Выход белкового материала достигал 85% [246, 247].

Большой размер пор неподвижной фазы не всегда, однако, может гарантировать хорошие результаты хроматографического разделения, так как тип силикагелевой матрицы также оказывает существенное влияние на селективность. Сравнение ряда неподвижных фаз с большим диаметром пор показало [245], что неподвижная фаза видак TP с размером пор 330 Å наиболее предпочтительна для разделения белков, несмотря на то что лихросфер Si 1000 с размером пор 1000 Å и имеет ряд преимуществ при разделении особенно крупных белков [248]. В работе [416] опубликованы результаты прямого сравнения модифицированных октилом неподвижных фаз типа фаз Бейкербонда с размерами пор 100 и 330 Å, а также еще несколькими модифицированными неподвижными фазами.

Пирсон и др. [245] и Махони [413] исследовали влияние размеров колонки на разделение белков и обнаружили, что они слабо влияют на разрешение, но оказывают решающее воздействие на емкость. Неподвижная фаза видак TP RP-8 способна связывать около 20 мг смеси сывороточный альбумин/овальбу-

мин при использовании колонки размером 250×4 мм. Избыточный белок элюируется в виде пика пробоя колонки вследствие недоступности центров связывания. Как выяснилось, количество белка, который можно нанести на колонку, приблизительно пропорционально ее размерам. Поскольку короткие колонки разделяют белки приблизительно с такой же эффективностью, что и длинные, было высказано предположение, что белки взаимодействуют с носителем по механизму многоточечного связывания [413] и разделение происходит по механизму адсорбции — десорбции на поверхности неподвижной фазы [249], а не в результате распределения между неподвижной и подвижной фазами. Эта интерпретация результатов объясняет, в частности, почему градиентное элюирование при ВЭЖХ белков значительно более эффективно, чем изократическое.

Следует отметить, что порядок элюирования компонентов белковой смеси зависит не от их молекулярных размеров, а от ряда других свойств белка, таких, как гидрофобность, заряд поверхности молекулы и конформация основной и боковой цепей. Эффективную поверхностную гидрофобность и заряд таких больших молекул невозможно рассчитать, исходя из их общего аминокислотного состава [312], и поэтому предсказывать время удерживания белков значительно труднее, чем время удерживания пептидов [93].

В обращенно-фазовой ВЭЖХ белков чаще всего используются летучие органические кислоты или летучие буферные растворы. В многочисленных публикациях описывается применение разбавленной трифторуксусной кислоты [241, 242, 245, 246, 250, 413], реже — разбавленной пентафторпропионовой или гептафтормасляной кислоты [244, 413]. Длинные углеродные цепи последних двух кислот увеличивают гидрофобность молекул белка в результате ион-парного взаимодействия и тем самым увеличивают время удерживания либо, наоборот, повышают гидрофобность подвижной фазы и тем самым уменьшают время удерживания. Элюирование муравьиной кислотой высокой концентрации обеспечивает хорошее разделение и высокие выходы для многих нативных и модифицированных белков [401]. Во многих случаях для разделения были выбраны такие буферные системы, как пиридин/муравьиная кислота, рН около 4,0 [139, 247, 251—253, 416], и пиридин/уксусная кислота, рН около 5,0 [247, 252, 254]. Однако ввиду сильного поглощения в УФ-области при малых длинах волн муравьиной и уксусной кислот, а также пиридина обнаружение белков можно осуществлять только по поглощению при 280 нм, применяя послеколоночную обработку элюата флуорескаминном или другим реагентом, либо измерять радиоактивность меченых соединений или их биологическую активность (см. также раздел «Пептиды»). Во многих публикациях описывается применение для пригото-

ления элюента нелетучих солей, в основном фосфатов [255—259], при pH 6,0 или 2,0, иногда в сочетании с перхлоратами [260, 261]. Из числа других нелетучих солей следует отметить трис-ацетат [260] и ацетат натрия [262] при pH 7,5.

В качестве органических модификаторов в ВЭЖХ белков используются в принципе те же соединения, что и для разделения пептидов. Однако следует подчеркнуть трудность выбора системы растворителя достаточно полярной, чтобы растворять белки, и достаточно неполярной, чтобы их десорбировать. Наибольшее распространение в качестве органических модификаторов для ВЭЖХ белков получили ацетонитрил [242, 244, 246, 250, 255], 1-пропанол [247, 253, 254, 413, 416], 2-пропанол [245, 249, 257, 401, 413] и метанол [256, 258], а также их смеси [259, 263]. Авторы работы [242] описали преимущества ацетонитрила и метанола над этанолом и пропанолами в качестве органических модификаторов. Только при использовании первых двух растворителей получают острые хорошо разрешенные пики лизоцима (относительная мол. масса 15 000), овальбумина и сывороточного альбумина при разделении на γ -бондапаке C_{18} и фенильных неподвижных фазах. При элюировании пропанолом белки десорбируются при более низких концентрациях органического модификатора, что может оказаться определяющим в ряде случаев.

Некоторые белки неполностью выделяются из колонки при однократном градиентном элюировании. Авторы работы [243] показали, что оставшиеся на колонке белки можно удалить повторным градиентным элюированием (рис. 4.29). Более того, эти же авторы наблюдали частичную потерю на колонке белков в результате их денатурирования под действием гидрохлорида гуанидина. Авторы этой работы предположили, что белки в денатурированном состоянии могут удерживаться на колонках вследствие прямого гидрофобного взаимодействия или выпадения в осадок. Колонку можно очистить, а белок вымыть из нее путем последовательного элюирования сначала 70%-ной уксусной кислотой, насыщенной гидрохлоридом гуанидина, а затем ацетонитрилом в обычном градиентном режиме. Белок выходит при градиентном элюировании отдельным пиком при характерной для него концентрации ацетонитрила. Этот результат был интерпретирован как обратное свертывание белка из денатурированного состояния в конформацию, при которой его можно элюировать.

Аналогичные наблюдения были сделаны Пирсоном и др. [245]. При хроматографической очистке овальбумина на неподвижной фазе видак TP RP-8 в первом цикле элюируется только 60% нанесенного вещества, остальные 40% постепенно десорбируются на протяжении последующих 11 циклов. Этот эффект «памяти» обнаружен и для других белков, хотя степень его

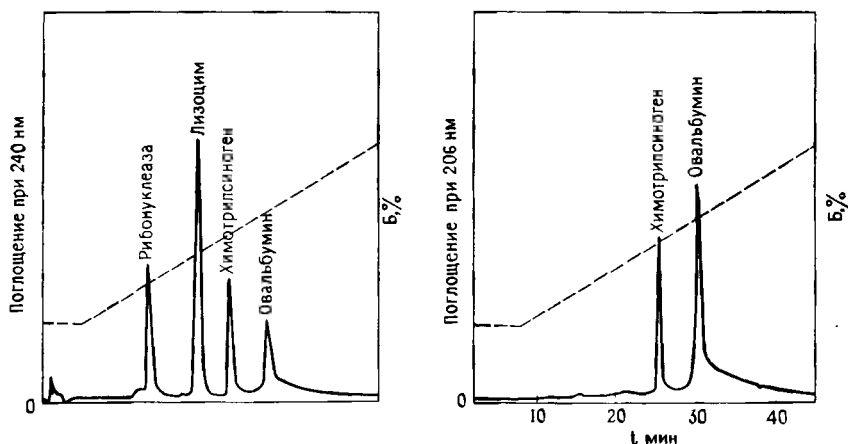


Рис. 4.29. «Эффект памяти» в обращеино-фазовой хроматографии белков [243]. *а* — разделение смеси белков (1 мг); *б* — холостое элюирование (белки не наносили) сразу после разделения, показанного на рис. *а*. Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: 0,05%-ная трифторуксусная кислота/0,05%-ная трифторуксусная кислота в ацетонитриле, градиентное элюирование.

проявления зависит от природы белка и условий хроматографического разделения.

Для улучшения растворимости и повышения степени очистки ряда мембранных белков с относительной молекулярной массой от 28 000 до 33 000 МакКин и Белл [264] добавляли 0,2% неионогенного детергента тритона X-100 в элюент состава триэтиламин/трифторуксусная кислота (pH 3,0)/ацетонитрил. При замене анионогенного детергента додецилсульфата натрия на неионогенный при повторном градиентном элюировании ни один белок из колонки не выделился. Явный недостаток тритона X-100 — его интенсивное поглощение в УФ-области, вынуждающее применять другие методы обнаружения. Кроме того, перед последующими анализами или хроматографическим разделением детергент приходится удалять.

Согласно опубликованным данным, в ряде случаев белки элюируются с обращенных фаз с сохранением биологической активности. Трипсин и химотрипсин (относительная мол. масса 25 000) были очищены хроматографически на фазах C_{18} и CN с малым размером пор элюированием смесью трифторуксусная кислота/ацетонитрил [250, 265]. Выделенные активные ферменты были использованы для приготовления гидролизатов белков. Авторы работы [255] разделили ряд кальцийсвязывающих белков, например калмодулин, тропонин С, парвальбумин и др., на неподвижной фазе μ -бондапак фенил при градиентном элюировании фосфатным буфером (pH 6,1)/ацетонитрилом.

Очищенные белки обладали биологической активностью. Эти авторы смогли показать, что присутствие в элюате ионов кальция уменьшает время удерживания некоторых белков, а это указывает на конформационные изменения, вызываемые ионами кальция. Некоторые типы интерферона с относительной молекулярной массой от 17 000 до 21 000 были очищены методом ВЭЖХ на обращенных фазах различных типов при нейтральных или кислых значениях pH, причем очищенные белки сохраняли свою активность [251, 262].

Обращенно-фазовая хроматография была также использована для облегчения связывания *цис*-комплекса платины с белками. Обнаружение осуществлялось по поглощению в УФ-области и посредством атомно-абсорбционного анализа [234].

4.3.3. Нормально-фазовая хроматография

В работах [139, 262, 397] описан особый случай распределительной хроматографии. Применяя в качестве неподвижной фазы лихсорб диол, белки плазмы крови и интерферон можно разделить в градиенте снижающейся концентрации *n*-пропанола, например от 80 до 50% органического модификатора. Поскольку все белковые компоненты сыворотки крови элюируются из колонки с фронтом растворителя, если она предварительно уравновешена 50%-ным *n*-пропанолом, этот вариант хроматографического разделения был интерпретирован как нормально-фазовая хроматография [139]. Этот вариант разделения пригоден только для гидрофобных белков, способных растворяться при высоких концентрациях органического растворителя. При разделении этим способом противовирусная активность интерферона не теряется [262, 397].

4.3.4. Ионообменная хроматография

ВЭЖХ-вариант ионообменной хроматографии белков очень похож на ее классический вариант в том отношении, что функциональные группы неподвижной фазы и системы растворителей, применяемые и в том, и в другом случае, аналогичны. Однако традиционные материалы для набивки колонок на основе целлюлозы, сшитого декстрана и аналогичных соединений недостаточно механически прочны для работы в условиях высоких объемных скоростей и больших давлений, в связи с чем возникла необходимость в материалах нового типа. На материалах нового типа разделение протекает значительно быстрее и с лучшим разрешением. Последнее обусловлено тем, что частицы новых неподвижных фаз имеют сферическую форму, малые размеры, однородны по размерам, отличаются высокой

пористостью, высокой ионообменной скоростью и поверхностной гидрофильностью.

Для получения подходящего материала для ионообменных ВЭЖХ-колонок было использовано много различных подходов (см. обзоры [266—268]). В частности, предпринимались попытки разработать неподвижные фазы на основе как органических, так и неорганических материалов. Первые успехи в этом направлении были достигнуты Микешом и др. [269], использовавшими производные метакрилатного геля, Чангом и др. [270, 271] и Кудиркой и др. [272], работавшими со стеклом с контролируемой пористостью.

Первые ионообменные фазы на основе неорганических материалов с модифицированной поверхностью были получены путем присоединения диэтиламиноэтильных (ДЭАЭ), метилдиэтиламиноэтильных (четвертичный АЭ), карбоксиметильных (КМ) или сульфопропильных (СП) функциональных групп к модифицированному глицерилпропилсилилом носителю (гликофаза), который представляет собой стеклянные частицы с контролируемой пористостью [270, 271]. Как показывает табл. 4.5, на носителях такого типа был разделен ряд белков. Следует, однако, отметить, что этот тип носителя в продажу не поступает.

Позднее были разработаны анионообменники на основе микропористых сферических частиц силикагеля, покрытых тонким (пленочным) слоем полиэтиленамина. Эти неподвижные фазы поступают в продажу под названием синхропак АХ-300. Диаметр пор этого материала равен 300 Å. Это слабый анионообменник, по своим ионообменным характеристикам близкий к ДЭАЭ-целлюлозе. Однако, поскольку в основу его положен силикагель, рабочие значения pH соответствуют диапазону от 2 до 8. На синхропаке АХ-300 проведено разделение нескольких различных белков (табл. 4.5), в том числе ряда изоферментов [273, 274, 298] и гемоглобинов различных типов [275, 276]. Достигнутое разрешение близко к наблюдаемому при гель-электрофорезе [277]. На рис. 4.30 показана хроматограмма, полученная при разделении изоферментов лактат-дегидрогеназы.

Авторы работы [278] показали, что хотя у коротких колонок (размером 50×4 мм) емкость по белку в 5—10 раз меньше по сравнению с длинными (размером 250×4 мм), первые сохраняют приблизительно 75% разрешающей способности [278]. На колонках размером 250×4 мм можно разделять до 10 мг таких белков, как сывороточный альбумин, овальбумин или аполипропротеин [278, 279]. Выход белков с колонок, в том числе и по ферментативной активности, составляет около 85% [266]. Однако при очистке малых количеств фермента их, как выяснилось, следует разбавлять раствором альбумина для получения воспроизводимых результатов [268]. На колонках можно прово-

Таблица 4.5. Применение ионообменной хроматографии для разделения белков

Неподвижная фаза	Характеристика неподвижной фазы	Функциональная группа	Соединение	Литература
ДЭАЭ-гликофаза	Слабый анионообменник на основе стекла	Диэтиламиноэтил-	Щелочная фосфатаза, арилсульфатаза, белки плазмы крови, целлюлаза, креатинкиназа, гемоглобин, лактатдегидрогеназа, гомогенат печени, альбумин, трипсин	270—273, 278—292
Синхропак АХ-300	Слабый анионообменник на основе силикагеля		α -1-Кислый гликопротеин, белок, закодированный в аденовирусе, аденилсукцината-синтетаза, аполипротеин, креатинкиназа, γ -глобулин, гемоглобин, гекокиназа, лактатдегидрогеназа, овальбумин, преальбумин, альбумин, трансферин	253, 270, 273—278, 280, 293, 298
TSK-ДЭАЭ	То же	Диэтиламиноэтил-	Альдегиддегидрогеназа, яичные белки, β -лактоглобулин, овальбумин, белки плазмы крови, альбумин	345, 403, 415
Покрытый полнэти- ленимином крупно- пористый силика- гель	» »		Липоксигеназа, ональбумин, альбумин	248
ДЭАЭ-сферон	Слабый анионообменник на основе полиакрилат	Диэтиламиноэтил-	Белки плазмы крови, глюкозооксидаза, протеаза плесневых грибов	284, 285
ДЭАЭ-Тойоперл или фрактогель	Слабый анионообменник	Диэтиламиноэтил-	Яичные белки, ферритин, γ -глобулин, гемоглобулин, β -лактоглобулин, миоглобин, овальбумин, рибонуклеаза, белки плазмы крови, тиреоглобулин, альбумин, ингибитор трипсина, уреаз	400, 403
Апак	Анионообменник		Цитохром Р-450	294

Четвертичная АЭ-гликофаза TSK-KM	Сильный анионообмен- ник на основе стекла	Метилдиэтил- аминоэтил-	Альбумин, химотрипсиноген, гемоглобин, многочисленные	270
	Слабый катионообмен- ник на основе сили- кагеля	Карбоксиметил-	Альдегид-дегидрогеназа, рибонуклеаза	345, 403
KM-силикагель	То же	Карбоксиметил-	Карбоангидраза, инсулин, β-лактоглобулин	281
Лихросорб КАТ	Катионообменник на ос- нове стекла		Карбоангидраза, инсулин, β-лактоглобулин	281
KM-гликофаза	Слабый катионообмен- ник на основе стекла	Карбоксиметил-	Цитохром c, соевый ингибитор трипсина	252, 270
Биорекс 70	Слабый катионообмен- ник на основе поли- акрилата	Карбоксил-	Цитохром c, гемоглобин	282, 286, 295, 296
Амберлит CG-50	То же	Карбоксил-	Цитохром c	282
KM-Сферон	» »	Карбоксиметил-	Химотрипсиноген, яичные белки, лизоцим, протеаза плесневых грибов, альбумин и его фрагменты	283, 285
Гидроксилапатит	Катионообменник	Фосфат-	Цитохром c	282
P-Сферон	Катионообменник на ос- нове полиакрилата	Фосфат-	Белки плазмы крови, химотрипсиноген, лизоцим, альбумин	283, 284
SP-гликофаза	Сильный катионообмен- ник на основе стекла	Сульфопропил-	Химотрипсин, трипсин	270
S-Сферон	Сильный катионообмен- ник на основе полиак- рилата	Сульфонил-	Глюкозооксидаза	284
Партисил SCX	Сильный катионообмен- ник на основе силика- геля	Сульфонил-	Карбоангидраза, инсулин, интерферон, β-лактоглобулин, трансформрующий фактор роста	281, 297

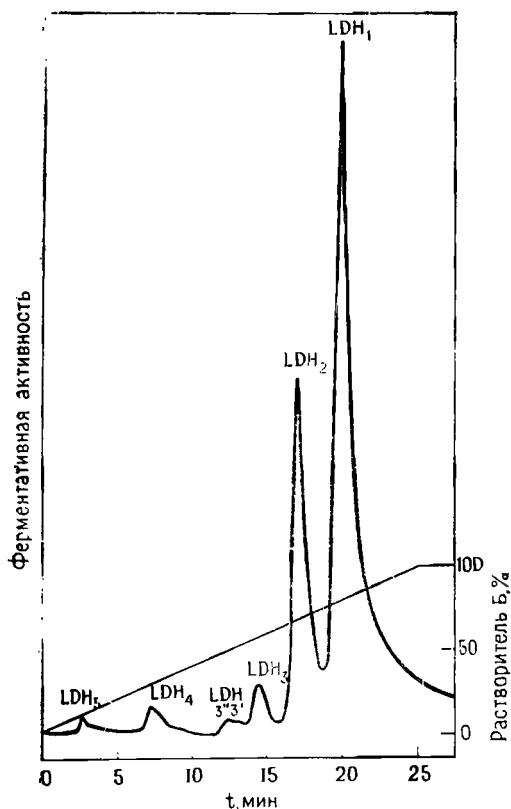


Рис. 4.30. Разделение изоферментов лактат-дегидрогеназы (ЛДГ) методом анионообменной хроматографии [277].

Неподвижная фаза: синхропак АХ-300; элюент: 0,02 М трис-ацетат (рН 7,9)/0,02 М трис-ацетат, 0,4 М ацетат натрия (рН 7,9), градиентное элюирование.

дить несколько сот разделений, снижения их эффективности при этом не наблюдается [276].

При разделении на синхропаке АХ-300 в качестве буферной системы наиболее часто используют трис-ацетат, рН около 8,0, при градиентном изменении концентрации ацетата натрия в процессе элюирования [275, 277, 278, 280]. Разделение аполипротеинов было с успехом проведено при элюировании буферными системами, содержащими 6 М мочевины [279]. На колонках с внутренним диаметром 4 мм самое лучшее разделение достигается при объемных скоростях до 0,25 мл/мин. Пример такого разделения приведен на рис. 4.31.

При таких низких объемных скоростях длительность анализа составляет от 2 до 3 ч. Обнаружение белка в элюате проводится по поглощению в УФ-области при 280 нм, а ферменты обнаруживают по ферментативной активности, в основном при помощи специфического для данного фермента реакционного детектора [268].

В работе [248] описан новый тип ионообменной неподвижной фазы на основе силикагеля, покрытого слоем полиэтиленimina. В этом материале применен силикагель с еще большим размером пор — от 1000 до 4000 Å. Значительно более толстый слой полиэтиленimina химически связан с поверхностью силикагеля, что повысило ионообменную емкость и эффективность разделения. Селективность разделения, как установлено, зависит от размера пор. Однако пока неподвижные фазы этого типа изучены слабо. В продажу они не поступают.

Относительно недавно было выдвинуто предложение проводить разделение белков на сильном катионообменнике на основе силикагеля, получившем название партисил SCX. Авторы работы [281] изучили разделение на партисиле SCX меченных радиоактивными изотопами карбоангидразы, β -лактоглобулина и высокомолекулярного трансформирующего фактора роста [281]. Элюирование проводилось буферной системой пиридин/ацетат аммония в градиентном режиме при pH от 2,5 до pH 6,0. Радиоактивность получаемых фракций элюата контролировалась. Особенно хорошее разделение и высокие выходы были получены при повышенной температуре.

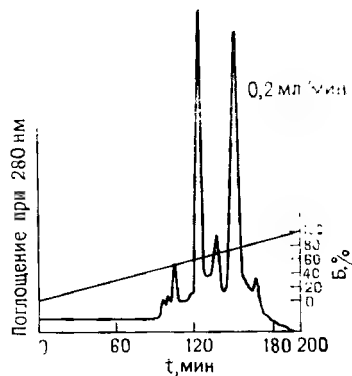
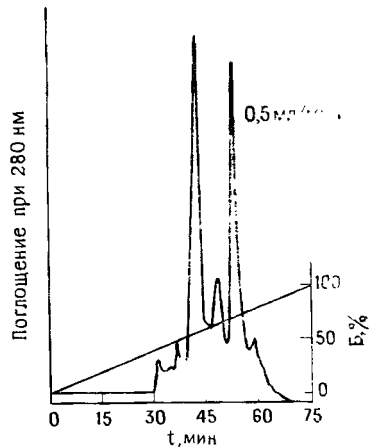
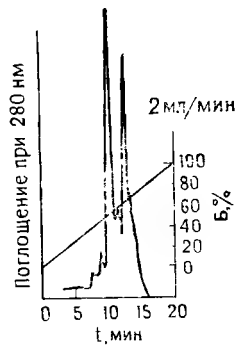


Рис. 4.31. Разделение коммерческого овальбумина методом анионообменной хроматографии при различных объемных скоростях [278].
Неподвижная фаза: синхропак АХ-300; элюат: 0,2 М трис-ацетат, (pH 8,0)/0,2 М трис-ацетат, 0,5 М ацетат натрия (pH 8,0).

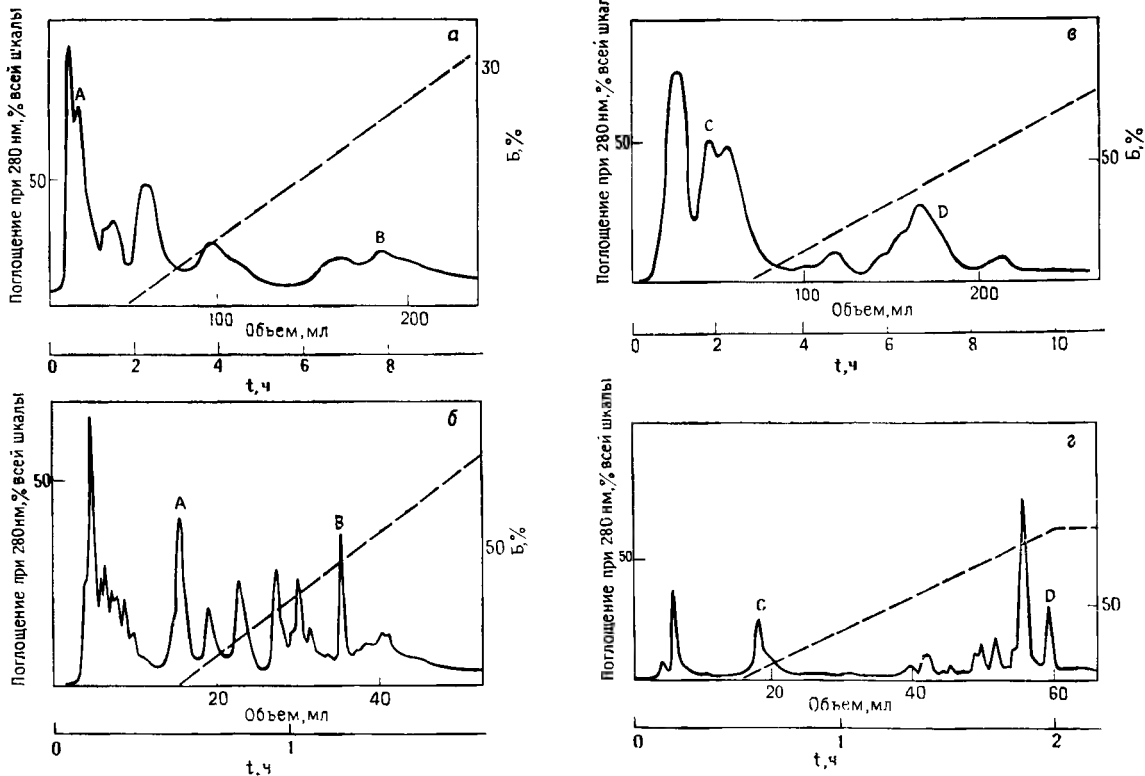


Рис. 4.32. Сравнение ВЭЖХ и классической ионообменной хроматографии [345].

Неподвижная фаза (колонка): *а* — КМ-целлюлоза (150×9 мм), *б* — ультрапак TSK 535 КМ (150×7,5 мм), *в* — ДЭАЭ-биогель (120×10 мм), *г* — ультрапак TSK 545 ДЭАЭ (15×7,5 мм); элюент: *а* и *б* — градиентный режим, 0,02 М ацетат аммония, 8 М мочевины (рН 5,0)/0,02 М ацетат аммония, 8 М мочевины (рН 5,0), 0,1 М хлорид натрия, *в* и *г* — градиент, 0,02 М бикарбонат аммония/0,2 М бикарбонат аммония.

В последние несколько лет в продажу поступили новые ионообменные неподвижные фазы на основе силикагеля, разработанные фирмами SynChrom, Pharmacia и Toyo Soda Corporation. Однако мы пока располагаем всего лишь несколькими публикациями, описывающими свойства этих фаз. Ионообменники TSK, ДЭАЭ и КМ выпускаются с двумя различными размерами пор — 130 и 240 Å. Сравнение фазы TSK и классических ионообменных неподвижных фаз показало [345] огромное преимущество первых (рис. 4.32). Хорошее разделение на ионообменниках TSK было получено также авторами работ [403, 415].

Совершенно иным типом неорганического материала для ионообменной ВЭЖХ является гидроксилapatит, или фосфат кальция. На материале этого типа успешно проведено разделение производных цитохрома *c*.

Ряд чисто органических ионообменников для ВЭЖХ разработан на основе метакрилата. Некоторые из имеющихся в продаже материалов различного типа, в том числе ряд замещенных сферононов, биорекс 70 и амберлит CG-50 были использованы для разделения белков. Авторы работ [283—285] синтезировали карбоксиметил-, фосфо-, сульфо- и диэтиламиноэтилпроизводные сферона 300, которые в дальнейшем использовали для проведения большого числа разделений (табл. 4.5). Согласно данным работы [283], предел эксклюзии сферона 300 составляет 500 000. Одно из важных достоинств ионообменников на основе сферона — их высокая химическая стойкость при экстремальных значениях pH. Количество белка, которое можно разделить на ионообменниках на основе сферона, по-видимому, несколько выше рекомендованного для колонок того же размера с синхропаком AX-300. Согласно наблюдениям Микеша, с ионообменников на основе сферона порядок элюирования белков соответствует их изоэлектрическим точкам. Это доказывает, что разделение белков в этом случае осуществляется по ионообменному механизму, хотя сферон более гидрофобен, чем целлюлоза и полидекстраны, что может привести к образованию гидрофобных связей с белками [283]. Ионообменники на основе сферона сохраняют устойчивость при высоких объемных скоростях и давлениях [283]. Хорошее разделение, как показывает рис. 4.33, может быть достигнуто в течение одного часа. Поступающие в продажу ионообменники на основе сферона 1000 отличаются от использованного Микешем и сотрудниками тем, что их предел эксклюзии равен 1 000 000, что соответствует размеру пор 370 Å [283]. Однако размеры частиц сферона довольно велики — около 20 мкм.

Новым многообещающим типом ионообменников на органической основе является ДЭАЭ-тойоперл, который очень устойчив к действию буферных систем с экстремальным значением pH, высоким объемным скоростям и давлениям. Авторы работ [400,

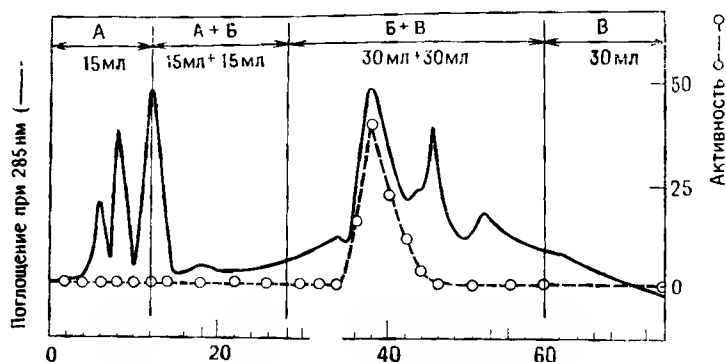


Рис. 4.33. Разделение технической глюкозооксидазы методом анионообменной хроматографии [266].

Неподвижная фаза: ДЭАЭ-сферон; элюент: А — 0,01 М ацетат натрия (рН 6,8), Б — 0,3 М ацетат натрия (рН 5,5), В — 0,3 М ацетат натрия, 0,1 М хлорид натрия (рН 5,5).

403] выполнили на нем большое число разделений белков с хорошим разрешением и выходами. Однако размер частиц этого ионообменника очень велик: от 20 до 30 мкм.

Свойства нежестких катионообменников биорекс 70 и амберлит CG-50 рассматривают авторы работ [282, 286]. Для описанных ими целей эти неподвижные фазы вполне подходят. Однако использование этих материалов создает определенные проблемы, так как они недостаточно механически устойчивы и так как поступающие в продажу образцы имеют большой размер частиц.

4.3.5. Гель-проникающая хроматография

В идеале в процессе гель-проникающей хроматографии белковые молекулы разделяются в соответствии с величиной гидродинамического объема. Самые большие молекулы практически не включаются в поры геля, средние распределяются по порам в соответствии с молекулярным объемом, а маленькие целиком включаются в поры. На практике, однако, различного рода взаимодействия между молекулами белка и поверхностью неподвижной фазы нарушают этот идеальный механизм. Так, заряженная поверхность неподвижной фазы в зависимости от заряда белковой молекулы вызывает ионную сорбцию или ионную эксклюзию. Гидрофобная поверхность вызывает гидрофобную сорбцию, а в ряде случаев и денатурацию белков.

Классические материалы для гель-проникающей хроматографии типа сшитого декстрана, агарозы и полиакриламида слишком мягки для ВЭЖХ. Первыми жесткими носителями, использованными для разделения белков, были силикагели и стекло

Таблица 4.6. Неподвижные фазы для гель-проникающей хроматографии

Неподвижная фаза	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Диапазон разделения, относительная молекулярная масса $\times 10^{-3}$		
			для обычных буферов	для 6М гуанидин-HCl	для 0,1%-ного SDS
TSK 2000 SW или TSK-125	10	130	0,5—60	1—25	15—25
TSK 3000 SW или TSK-250	10	240	1—300	2—70	10—100
TSK 4000 SW или TSK-400	13	450	5—1000	3—400	15—300
TSK 3000 PW или TSK 30	13	200	До 300		
TSK 4000 PW или TSK 40	13		До 1000		
TSK 5000 PW или TSK 50	17		10—10 000		
TSK 6000 PW	17		До 30 000		
Тойонерл или фрактогель HW 40	15—40		0,1—10		
Тойонерл или фрактогель HW 50	25—40		0,5—200		
Тойонерл или фрактогель HW 55	25—40		1—1000		
I—60	10	60	1—20		
I—125	10	125	2—80		
I—250	10	250	10—500		
Лихросорб диол	5 или 10		10—10		
Синхропак GPC-100	10	100	5—500		
Синхропак GPC-500	10	500	10—3000		

с контролируемым размером пор, однако имеющиеся на их поверхности отрицательно заряженные силанольные группы отрицательно влияют на процесс разделения. Удовлетворительные материалы были получены путем модификации поверхностных силанольных групп силикагеля и стекла глицерилпропил-силильными группами; эти материалы получили название гликофазы и диолфазы [271]. Авторы работы [301] проводили химическое присоединение N-ацетиламинопропильных групп; полученные таким способом материалы были названы аминокислотными фазами.

В настоящее время в продажу поступает большое число неподвижных фаз, предназначенных для водной гель-проникающей ВЭЖХ. Получившие наибольшее распространение материалы для этого типа белковой ВЭЖХ и их пределы эксклюзии приведены в табл. 4.6. Свойства ряда колонок, выпускаемых промышленным способом, рассмотрены в работе [404].

Во многих статьях описаны свойства и области применения материалов, выпускаемых фирмой Toyo Soda Corporation, которые называются TSK-гели. В продажу поступает три различных типа материалов (табл. 4.6): SW, PW и HW. TSK-гель типа SW разработан на основе силикагеля, и диапазон рабочих значений pH соответственно лежит в пределах от 2 до 8. Этот

материал имеет весьма гидрофильную поверхность с большим числом гидроксильных групп. Начиная с 1978 г. он широко используется для очистки белков и определения их характеристик [302—311]. В литературе сообщается о хороших выходах белков и сохранении ими биологической активности при хроматографировании на материалах этого типа.

Гель SW может иметь поры различных размеров. Соответствующие им диапазоны разделения были тщательно изучены, и колонки, заполненные этим гелем, были использованы для определения размеров белковых молекул. Как выяснилось, градуировочные кривые зависимости объема элюирования от молекулярной массы, полученные при элюировании обычными буферами [302, 303, 306, 307, 313—320], отличаются от полученных при работе с буферами, содержащими такие денатурирующие агенты, как 6 М гидрохлорид гуанина [321—324], 0,1%-ный додецилсульфат натрия [327—332] или 1%-ный додецилсульфат натрия/20%-ный метилцеллозольв [335]. Соответствующие приблизительные диапазоны разделения указаны в табл. 4.6. Некоторые градуировочные кривые, опубликованные в работах [314, 322, 328], представлены на рис. 4.34.

На принципиальную важность правильного подбора концентраций додецилсульфата натрия и солей буфера для успешного элюирования указывают авторы работ [327, 328, 332]. Этот факт можно проиллюстрировать следующим наблюдением. При использовании 8 мМ раствора детергента в воде без солей такие белки, как сывороточный альбумин, овальбумин и β -лактоглобулин, элюируются в свободном объеме колонки. При использовании 0,74 мМ раствора детергента в 0,1 М фосфатном буфере все они разделяются. В 0,46 мМ растворе детергента в 0,2 М фосфатном буфере они вновь элюируются одновременно, но время удерживания значительно возрастает [322]. Оптимальная концентрация буфера при использовании 0,1%-ного додецилсульфата составляет 0,05—0,2 М [328].

Белки, которые разделяли в присутствии 6 М гидрохлорида гуанидина или 0,1%-ного додецилсульфата натрия, предварительно меркаптолизировали и S-алкилировали [321, 322, 328] или только меркаптолизировали [327, 329].

Как метод определения молекулярной массы гель-проникающую ВЭЖХ можно сравнить с электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Электрофоретический метод отличается более высоким разрешением и допускает параллельный анализ нескольких образцов. Однако хроматографический метод превосходит его по чувствительности, возможности количественной обработки результатов анализа и простоте выделения разделенных компонентов. Время, затрачиваемое на проведение одного хроматографического цикла, меньше необходимого для проведения одного электро-

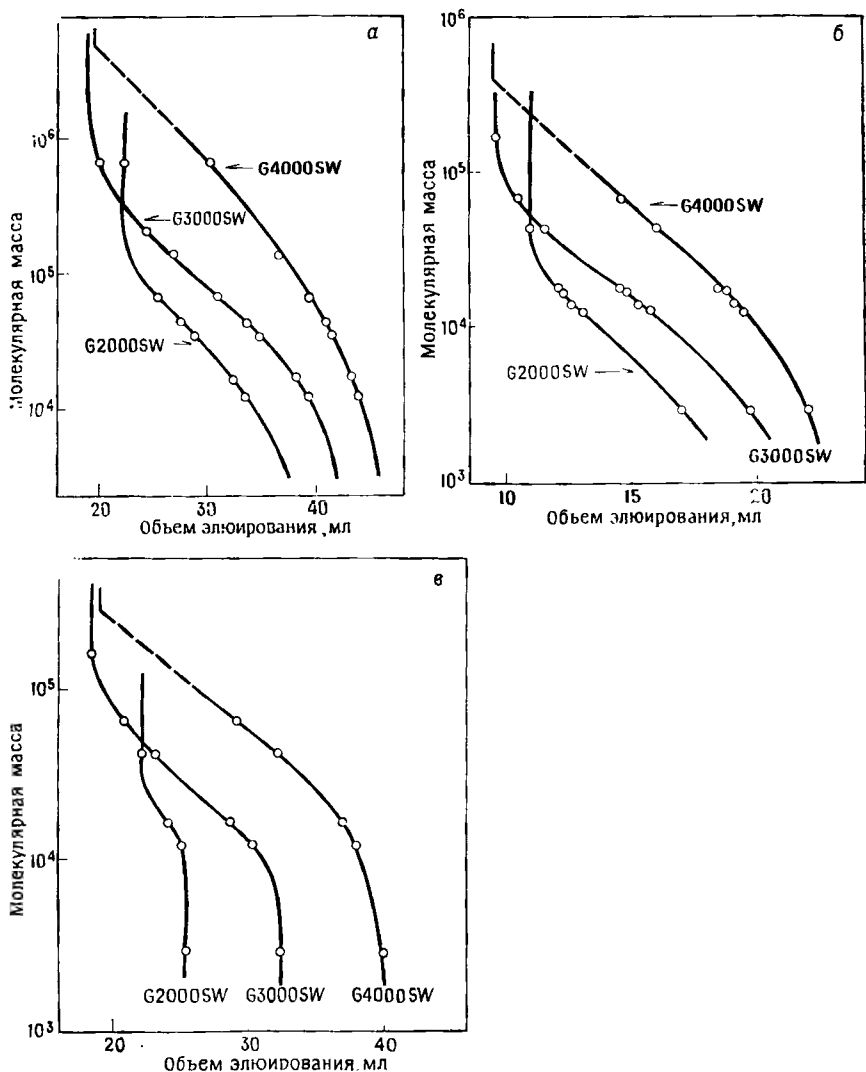


Рис. 4.34. Градуировочные кривые, полученные для белков методом гель-проникающей хроматографии на TSKSW в различных условиях [314, 322, 328].

Неподвижные фазы: TSK SW, указаны на рисунках; элюент: *a* — 0,1 М фосфат натрия, (pH 7,0), 0,3 М хлорид натрия; *б* — 0,1 М фосфат натрия (pH 6,0), 6 М гуанидингидрохлорид, *в* — 0,1 М фосфат натрия (pH 7,0), 0,1% додецилсульфат натрия.

форетического цикла, в основном благодаря отсутствию стадии окрашивание — обесцвечивание. Количества пробы примерно одинаковы для обоих методов. Соответствующий диапазон разделения при использовании хроматографического метода может быть выбран, из размера пор, что аналогично выбору состава геля в электрофоретическом методе. Поведение полипептидов с высоким содержанием углеводов в структуре было специально исследовано применительно к этому типу хроматографии [323].

Авторы работы [336] разработали «двумерную» систему для разделения белков сыворотки крови: сначала разделение осуществляется методом изоэлектрической фокусировки, а затем в другом направлении — методом гель-проникающей ВЭЖХ на колонке с TSK 3000 SW. Таким способом можно разделить более 70 компонентов, что, однако, значительно меньше описанного для системы двумерного геля О'Фаррелла [236].

Следует упомянуть еще несколько примеров применения ВЭЖХ на неподвижных фазах типа TSK SW. Этим методом удалось разделить ряд очень сложных смесей — белки сыворотки крови [302, 306, 309, 314, 336, 338], мочи [317]. и молока [306, 307].

Ферменты β -галактозидаза и уреаза были выделены из грубых экстрактов на неподвижной фазе TSK 3000 SW с выходом по ферментативной активности, близким к количественному [303]. Ряд изоферментов урокиназы с различными молекулярными массами можно количественно охарактеризовать посредством анализа на TSK 3000 SW. Выход по ферментативной активности в этом случае составляет 95—100% [304, 339]. Протеолитическая активация протромбина изучалась хроматографически на TSK 3000 SW; время удерживания кальцийсвязывающих ферментов было больше в присутствии ионов кальция [414]. Образование комплекса ингибитором протеиназ из сыворотки крови и различными сериновыми протеиназами можно изучать методом хроматографии на TSK 2000 и 3000 SW [340].

Гетерогенность липопротеинов сыворотки крови можно установить путем их разделения на TSK 3000 и 4000 SW после специфического окрашивания липопротеинов диформазановыми красителями [319] или путем избирательного обнаружения холина и холестерина в элюате [318].

Металлопротеины были идентифицированы в экстрактах печени, почек и селезенки с использованием разделения на неподвижной фазе TSK 3000 SW и специфических методов обнаружения [311, 342].

Мембранные белки из *Halobacterium* были очищены на колонках с TSK 3000 и 4000 SW элюированием буферным раствором, содержащим 0,1% додецилсульфата натрия [330, 331]. Мембранный белок цитохром *b*-561 был проанализирован в присутствии 0,1%-ного неионогенного детергента тритона X-100 на

колонке с TSK 3000 SW с целью оценки степени его чистоты и вероятности образования связей детергент—белок [344].

Неподвижные фазы типа TSK SW наиболее удобны для разделения крупных фрагментов пептидов. Изучение разделения фрагментов бромцианового расщепления белка капсида вируса и триптических фрагментов альдегид-дегидрогеназы методом хроматографии на колонке с TSK 2000 SW показало, что этот метод хроматографии отличается более высокой разрешающей способностью, чувствительностью и быстротой проведения анализа по сравнению с классической хроматографией на мягких гелях. Полученная хроматограмма представлена на рис. 4.35. Определенный недостаток ВЭЖХ-варианта гель-проникающей хроматографии — низкая емкость колонок по белку. Если этим методом проводят обессоливание проб белка, то на колонку можно наносить только небольшие объемы.

Второй тип носителя TSK, имеющий индекс PW, представляет собой полужесткий гидрофильный полимер, устойчивый к действию растворителей в диапазоне pH от 2 до 12. В продаже имеется несколько его видов, различающихся размером пор (табл. 4.6). Хотя он не рекомендован как наиболее пригодный для разделения белков, в ряде работ [346—348] опубликованы градуировочные кривые зависимости объема элюирования белков от их молекулярной массы. Колонки с TSK PW были использованы и отдельно, и в сочетании с колонками TSK SW для разделения и анализа липопротеинов сыворотки крови [348—350].

Третий, новейший тип носителя для гель-проникающей хроматографии фирмы Toyo Soda Corporation получил название тойоперл HW, или фрактогель HW. Этот полужесткий гидрофильный полимер, поры которого могут иметь различные размеры, устойчив в очень широком диапазоне значений pH. Размер его частиц больше, чем у типов SW и PW, и составляет от 25 до 40 мкм или больше. Для тойоперла HW 55 — носителя, на котором можно проводить фракционирование белков с относительной молекулярной массой от 10 000 до 1 000 000, опубликована градуировочная кривая и данные по выходу по ферментативной активности, который был очень высоким [351]. Однако о его применении пока известно очень мало.

Колонки с Waters I-125 используются в тех же целях, что и колонки с TSK SW [352]. Для этого материала также получены градуировочные кривые для определения молекулярной массы в диапазоне от 2000 до 20 000 [320, 353]. Поскольку основу его составляет силикагель, он может работать в диапазоне значений pH от 2 до 8. Автор работы [354] рекомендовал добавлять в буферный раствор при определении молекулярной массы белков до 20% этанола. При очистке гидрофобного цитохрома с добавляют 1% дезоксихолата [354]. Опубликованы данные

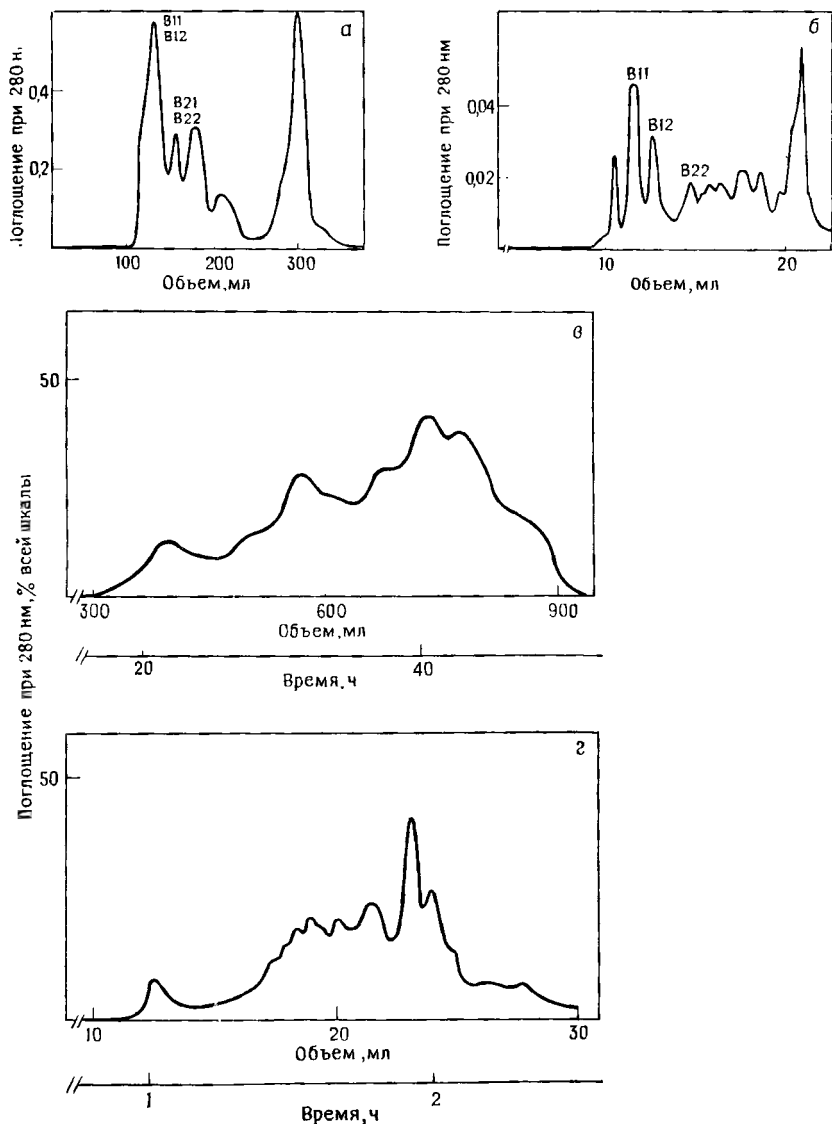


Рис. 4.35. Сравнение ВЭЖХ и классической гель-проникающей хроматографии [305, 345].

Неподвижная фаза (колонка): а и в — сефадекс G-50 мелкий (2000×15 мм), б — TSK 2000 SW (500×7,5 мм), г — TSK 2000 SW (600×7,5 мм); элюент: а и в — 30%-ная уксусная кислота, б и г — 0,1 М бикарбонат аммония; проба: а и б — фрагменты белка вируса, полученные обработкой бромцианом, в и г — трипсиновый гидролизат альдегид-дегидрогеназы.

о хороших выходах биологически активных белков [352, 355].

Основу большой группы неподвижных фаз составляет глицирилпропилсилилированное пористое стекло или силикагель. Если для получения таких фаз используется стекло с контролируемой пористостью, полученный продукт называется гликофаза G [271, 361], а если в основу его положен силикагель с мелкими частицами неправильной формы — лихросорб, то полученный продукт называется лихросорб диол [362, 363]. Если же основу неподвижной фазы составляет сферический силикагель лихросфер или видак TP Si, продукт называется синхропак GPS [263, 266, 271, 277, 356, 259, 260]. Многие из таких носителей поступают в продажу. Размеры пор у таких носителей могут быть самыми различными, но наибольшее распространение получили носители с порами диаметром 100 Å. Как и для других носителей на основе стекла или силикагеля, рекомендованный диапазон значений pH ограничен от 2 до 8.

Гликофазы G были использованы для изучения связывания сывороточного альбумина с лекарственными средствами [361]. Авторы работ [362, 363] получили кривую зависимости объема элюирования от молекулярной массы белков для колонок с лихросорбом диолом, которая оказалась линейной в диапазоне 10 000—100 000.

В нескольких статьях описано хроматографическое разделение на колонках с синхропак GPS-100 с порами размером 100 Å. Авторы ряда статей сообщают о линейности градуировочных кривых для определения молекулярных масс белков в диапазоне от 5000 до 500 000, полученных при использовании обычных буферов [266, 356], и от 1000 до 70 000 для буферов, содержащих 1% додецилсульфата натрия [263]. Сообщается также о хороших выходах белков с сохранением биологической активности [404]. Добавление к буферу 1% додецилсульфата натрия и 30% метанола значительно улучшает выход белков [263]. Изучены также аналогичные носители на основе силикагеля с порами размером 300 и 500 Å [266, 360]. В большинстве своих работ Шварц и др. [360] использовали в качестве элюента 50%-ную муравьиную кислоту, и никакого отрицательного влияния на носитель это не оказывало.

Следует отметить некоторые общие свойства гель-проникающей хроматографии. Размер колонки, как это со всей очевидностью установлено, влияет на разрешение и на емкость. Длина поступающих в продажу колонок составляет от 25 до 60 см. Однако в печати сообщается и об использовании колонок длиной от 120 до 180 см, причем даже в аналитических целях. Диаметр колонки не должен быть слишком маленьким, более широкие колонки дают лучшее разрешение [266]. Увеличение как массы, так и объема пробы отрицательно сказывается на разрешении [266, 277, 362]. На колонку диаметром 7,5 мм

можно наносить пробу в несколько миллиграмм белка. Для получения оптимальных результатов объем пробы должен быть меньше 100 мкл. Следует учитывать растворимость белка и вязкость раствора пробы. Высокая вязкость вызывает размывание полос.

Тщательное изучение влияния скорости элюента на разрешение [266, 313] показало, что для получения оптимального разрешения объемная скорость должна быть очень низкой: так, для колонки диаметром 7,5 мм она должна составлять от 10 до 50 мкл/мин. Однако в большинстве публикаций сообщается об использовании значительно более высоких объемных скоростей — от 0,5 до 1 мл/мин. В то же время объемная скорость не влияет на объем удерживания, поэтому следует искать разумное компромиссное соотношение между разрешением и временем, затрачиваемым на проведение анализа. Качество разделения в очень большой степени зависит от состава растворителя, так как он влияет на взаимодействие между белком и неподвижной фазой [404]. Этот эффект был специально изучен для неподвижных фаз на основе силикагеля. Остаточные свободные силанольные группы выступают в роли остатков слабой кислоты с pK от 3,5 до 4,0 [359]. В результате влияние заряда проявляется в виде ионной эксклюзии при значениях pH растворителя выше изоэлектрической точки белка и ионной сорбции при значениях pH ниже изоэлектрической точки белка, но выше pK силанольных групп. При минимизации взаимодействий белка и неподвижной фазы, т. е. при проведении разделения в области значений pH , близких к изоэлектрической точке белка, мы только приближаемся к идеальному процессу гель-проникающей хроматографии [359]. Эти эффекты показаны на рис. 4.36.

Наиболее сильное взаимодействие возникает при низкой ионной силе элюента, в то время как более высокие концентрации соли экранируют заряды [301, 359, 363]. Отклонения от идеальности при проведении гель-проникающей хроматографии могут в ряде случаев при решении некоторых проблем разделения обернуться преимуществами, как это показано в работе [359]. Необходимость подбора оптимального типа соли для приготовления буфера, концентрации и значения pH буфера была продемонстрирована в работах, посвященных разделению различных типов урокилазы [304] и сывороточных липопротеинов [349], и ряде других исследовательских работ, в которых изучалось разделение многих белков с использованием буферов, содержащих додецилсульфат [327, 328, 332]. Во многих случаях для защиты неподвижной фазы аналитических колонок от загрязнения рекомендуется помещать между насосом и основной колонкой на линии высокого давления небольшую предколонку.

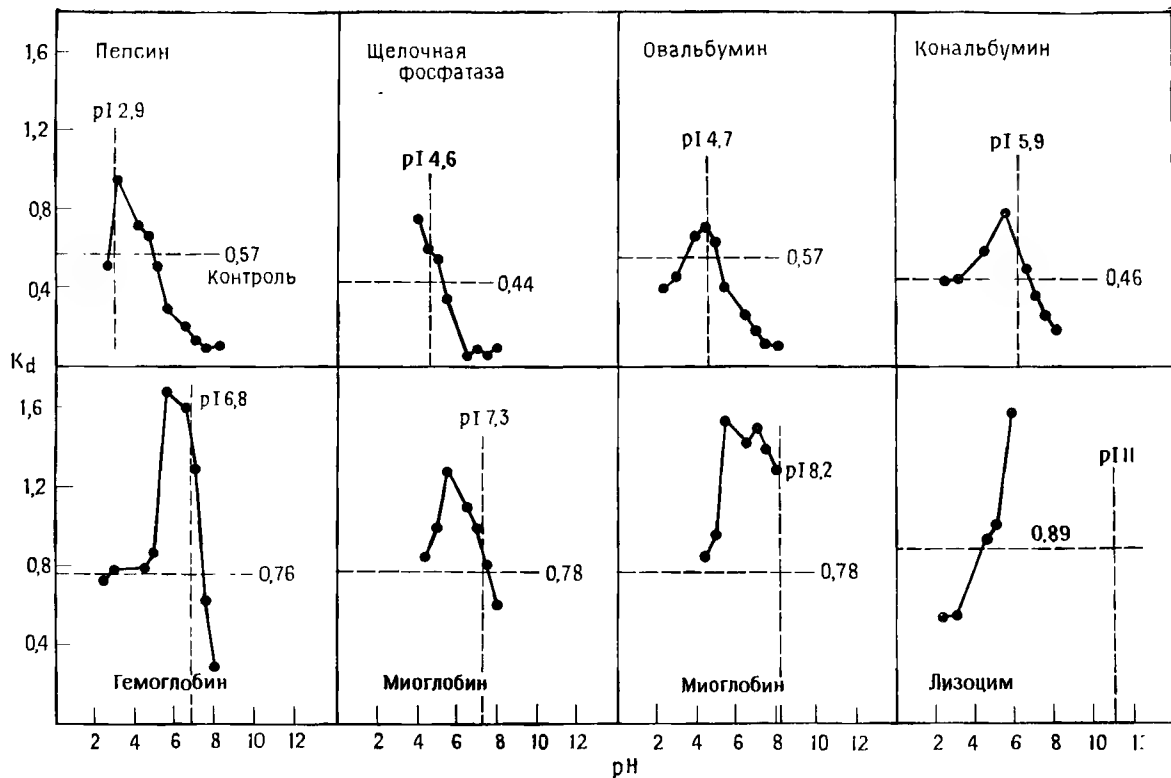


Рис. 4.36. Влияние величины pH на константу распределения [359].

Неподвижная фаза: TSK 3000 SW; элюент: фосфатный или ацетатный буферные растворы с ионной силой 0,001.

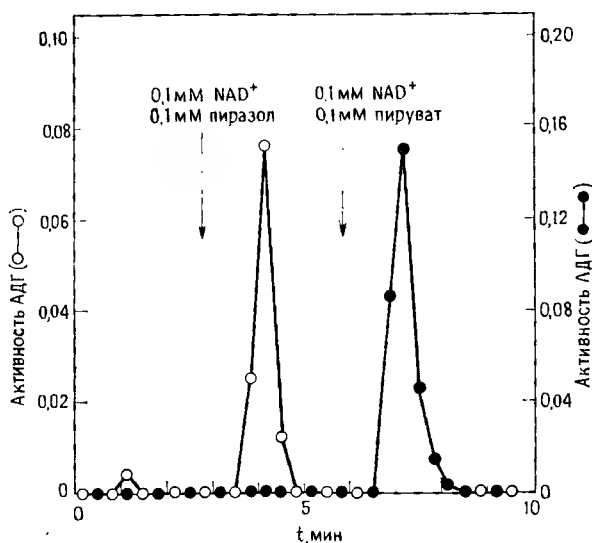


Рис. 4.37. Разделение лактат- и алкоголь-дегидрогеназы методом аффинной хроматографии [364].

Неподвижная фаза: АМФ-силикагель; элюент: 0,1 М фосфат натрия (рН 7,5); температура: комнатная.

4.3.6. Аффинная хроматография

ВЭЖХ-вариант биоаффинной хроматографии рассматривается лишь в считанном числе работ. Первым в 1978 г. появилось сообщение о применении в качестве неподвижной фазы глицерилпропилсилилированного лихросорба Si 60 с порами размером 60 Å, модифицированного аминоксиль-АМФ или антителами к человеческому сывороточному альбумину [364]. На АМФ-колонке разделяли смесь алкоголь-дегидрогеназы, лактат-дегидрогеназы и сывороточного альбумина путем биоспецифического элюирования или элюирования раствором с высокой концентрацией соли. Пример такого разделения показан на рис. 4.37.

На колонке с иммобилизованными антителами к человеческому сывороточному альбумину разделяли бычий и человеческий сывороточные альбумины при снижении рН элюента. В работе [365] описано применение двух других иммобилизованных антител. Иммобилизация антител проводилась под воздействием аналогичной неподвижной фазы глицерилпропилсилилированного лихросорфа Si 1000 с порами размером 1000 Å. Колонка с антителами к человеческому иммуноглобулину G использовалась для изучения взаимодействия антиген — антитело. Десорбция достигалась путем снижения рН элюента. Колонку с иммобилизованными моноклональными антителами на инсулин элюировали разбавлением ацетонитрилом. Во всех

этих экспериментах наблюдалось практически количественное специфическое связывание и только незначительное неспецифическое взаимодействие [364, 365].

4.4. Заключение

Итак, методы ВЭЖХ широко используются в химии белков, пептидов и аминокислот в целях выделения и очистки этих соединений и для определения их биохимических характеристик. Многие методы ВЭЖХ можно рассматривать как существенно улучшенные варианты классических методов. Однако целый ряд методов представляет собой оригинальные разработки в области ВЭЖХ. Все указанные методы отличаются высокой чувствительностью, самой пока высокой разрешающей способностью и позволяют проводить разделение с высокой скоростью.

Литература

1. Sober H. A. (ed.), in: Handbook of Biochemistry, B3, The Chemical Rubber Co. 1970.
2. Wold F. Ann. Rev. Biochem., **50**, 783 (1981).
3. Spackman D. H., Moore S., Stein W. H. Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
4. Molnar I., Horvath C. J. Chromatogr., **142**, 623 (1977).
5. Radjai M. K., Hatch R. T. J. Chromatogr., **196**, 319 (1980).
6. Schuster R. Anal. Chem., **52**, 617 (1980).
7. Foucault A., Gaude M., Oliveros L., J. Chromatogr., **185**, 345 (1979).
8. Roth M. Anal. Chem., **43**, 880 (1971).
9. Ishida Y., Fujita T., Asai K. J. Chromatogr., **204**, 143 (1981).
10. Drescher D. G., Lee K. S. Anal. Biochem., **84**, 559 (1978).
11. Tikhomirov M. M., Khorlin A. Y., Voetter W., Bauer H. J. Chromatogr., **167**, 197 (1978).
12. Drescher M. J., Medina J. E., Drescher D. G. Anal. Biochem., **116**, 280 (1981).
13. Hughes G. J., Winterhalter K. H., Boller E., Wilson K. J. J. Chromatogr., **235**, 417 (1982).
14. Kraak J. C., Jonker K. M., Huber J. F. K. J. Chromatogr., **142**, 671 (1977).
15. Swarup G., Cohen S., Garbers D. L. J. Biol. Chem., **256**, 8197 (1981).
16. Yang J. C., Fujitaki J. M., Smith R. A. Anal. Biochem., **122**, 360 (1982).
17. Sanger F. Biochem. J., **39**, 507 (1945).
18. Zimmerman C. L., Pisano J. J., in: C. H. W. Hirs, Timasheff S. N. (eds.): Methods in Enzymology, XLVII, p. 45, Academic Press, New York-San Francisco-London, 1977.
19. Gray W. R., in: C. H. W. Hirs and S. W. Timasheff (eds.): Methods in Enzymology, XXV, p. 121, 333, Academic Press, 1972.
20. Bayer E., Grom E., Kaltenegger B., Uhmman R. Anal. Chem., **48**, 1106 (1976).
21. Wilkinson J. M. J. Chromatogr. Sci., **16**, 547 (1978).
22. Tapuhi Y., Miller N., Karger B. L. J. Chromatogr., **205**, 325 (1981).
23. De Jong C., Hughes G. J., van Wieringen E., Wilson K. J. J. Chromatogr., **241**, 345 (1982).
24. Mackey L. N., Beck T. A. J. Chromatogr., **240**, 455 (1982).
25. Tapuhi Y., Schmidt D. E., Lindner W., Karger B. L. Anal. Biochem., **115**, 123 (1981).
26. Kobayashi S., Imai K. Anal. Chem., **52**, 424 (1980)

27. Chang J.-Y., Knecht R., Braun D. G. *Biochem. J.*, **199**, 547 (1981).
28. Watanabe Y., Imai K. J. *Chromatogr.*, **239**, 723 (1982).
29. Cooper J. D. H., Turnell D. C. J. *Chromatogr.*, **227**, 158 (1982).
30. Umagat H., Kucera P., Wen L.-F. J. *Chromatogr.*, **239**, 463 (1982).
31. Kabus P., Koch G. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **108**, 783 (1982).
32. Turnell D. C., Cooper J. D. H. *Clin. Chem.*, **28**, 527 (1982).
33. Hill D. W., Walters F. H., Wilson T. D., Stuart J. D. *Anal. Chem.*, **51**, 1338 (1979).
34. Edman P. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
35. Edman P., Henschen A., in: S. B. Needleman (ed.): *Protein Sequence Determination* 2nd Ed., p. 232, Springer Verlag, Berlin, 1975.
36. Edman P., Begg G. *Eur. J. Biochem.*, **1**, 80 (1967).
37. Zimmermann C. L., Appella E., Pisano J. J. *Anal. Biochem.*, **77**, (1977).
38. Frank G., Strubert W. *Chromatographia*, **6**, 522 (1973).
39. McKean D. J., Maurer R. A. *Biochemistry*, **17**, 5215 (1978).
40. Moser P. W., Rickli E. E. J. *Chromatogr.*, **176**, 451 (1979).
41. Johnson N. D., Hunkapiller M. W., Hood L. E. *Anal. Biochem.*, **100**, 335 (1979).
42. Henderson L. E., Copeland T. D., Oroszlan S. *Anal. Biochem.*, **102**, 1 (1980).
43. Somack R., *Anal. Biochem.*, **104**, 464 (1980).
44. Fohlman J., Rask L., Peterson P. A. *Anal. Biochem.*, **106**, 22 (1980).
45. Nute P. E., Mahoney W. C. *Hemoglobin*, **4**, 109 (1980).
46. DiMari S. J., Robinson J. P., Hash J. H. J. *Chromatogr.*, **213**, 91 (1981).
47. Black S. D., Coon M. J. *Anal. Biochem.*, **121**, 281 (1982).
48. Simmons J., Schlesinger D. H. *Anal. Biochem.*, **104**, 254 (1980).
49. Gates F. T., Coligan J. E., Kindt T. J. *Biochemistry*, **18**, 2267 (1979).
50. Van Beeumen J., van Damme J., Tempst P., de Loy J., in: C. Birr (ed.): *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, p. 503, Elsevier, Amsterdam, 1980.
51. Rose S. M., Schwartz B. D. *Anal. Biochem.*, **107**, 206 (1980).
52. Zalut C., Harris H. W. J. *Biochem. Biophys. Meth.*, **2**, 155 (1980).
53. Lottspeich F. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1829 (1980).
54. Tarr G. E. *Anal. Biochem.*, **111**, 27 (1981).
55. Kim S. M. J. *Chromatogr.*, **247**, 103 (1982).
56. Chang J.-X. *Biochem. J.*, **199**, 557 (1981).
57. Horn M. J., Hargrave P. A., Wang J. K. J. *Chromatogr.*, **180**, 111 (1979).
58. Mancheva I. N., Nikolov R. N., Pfletschinger J. J. *Chromatogr.*, **213**, 99 (1981).
59. Takaya T., Kishida Y., Sakakibara S. J. *Chromatogr.*, **215**, 279 (1981).
60. Gil-Av E., Tishbee A., Hare P. E. J. *Am. Chem. Soc.*, **102**, 5115 (1980).
61. Gilon C., Leshem R., Grushka E. *Anal. Chem.*, **52**, 1206 (1980).
62. Nimura N., Toyama A., Kasahara Y., Kinoshita T. J. *Chromatogr.*, **239**, 671 (1982).
63. Weinstein S., Engel M. H., Hare P. E. *Anal. Biochem.*, **121**, 370 (1982).
64. Даванков В. А., Курганов А. А. *Хроматография*, **13**, 339 (1980).
65. Даванков В. А., Бошков А. С., Курганов А. А. *Хроматография*, **13**, 677 (1980).
66. Lindner W. *Naturwissenschaften*, **67**, 354 (1980).
67. Watanabe N., Ohzeki H., Niki E. J. *Chromatogr.*, **216**, 406 (1981).
68. Lindner W., LePage J. N., Davies G., Seitz D. E., Karger B. D. J. *Chromatogr.*, **185**, 323 (1979).
69. Hara S., Dobashi A. J. *Chromatogr.*, **186**, 543 (1979).
70. Takai M., Kumagai S., Kishida Y., Sakakibara S. *Peptide Chemistry*, p. 67, Protein Research Foundation, Osaka, 1978.
71. Bishop C. A., Harding D. R. K., Meyer L. J., Hancock M. S., Hearn M. T. W. J. *Chromatogr.*, **192**, 222 (1980).

72. *Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Hearn M. T. W.* Anal. Biochem., **89**, 203 (1978).
73. *Fullmer C. S., Wasserman R. H.* J. Biol. Chem., **254**, 7208 (1979).
74. *Bishop C. A., Hancock W. S., Brennan S. O., Carrell R. W., Hearn M. T. W.* J. Liq. Chromatogr., **4**, 599 (1981).
75. *Hobbs A. A., Grego B., Smith M. G., Hearn M. T. W.* J. Liq. Chromatogr., **4**, 651 (1981).
76. *Pereira L. V., Dolphin P. J.* Can. J. Biochem., **60**, 790 (1982).
77. *Heinemann F. S., Ozols J.*, in: M. Elzings (ed.): Methods in Protein Sequence Analysis, p. 435, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
78. *Fullmer C. S., Wasserman R. H.*, in: M. Elzinga (ed.): Methods in Protein Sequence Analysis, p. 489, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
79. *Williams K. R., L'Italien J. J., Guggenheimer R. A., Sillerud L., Spicer E. Chase J., Konigsberg W.*, in: M. Elzinga (ed.): Methods in protein sequence analysis, p. 499, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
80. *Darvean R. P., Seidah N. G., Chretien M., Lecomte J. J.* Virol. Meth., **4**, 77 (1982).
81. *Strickler M. P., Travis R. W., Olenick J. G.* J. Liq. Chromatogr., **5**, 1935 (1982).
82. *Anderson J. K., Mole J. E.* Anal. Biochem., **123**, 413 (1982).
83. *Efremov G. D., Wilson J. B., Huisman T. H. J.* Biochem. Biophys. Acta, **579**, 421 (1979).
84. *Wilson J. B., Lam H., Pravatmuang P., Huisman T. H. J.* J. Chromatogr., **179**, 271 (1979).
85. *Schroeder W. A., Shelton J. B., Shelton J. R.* Hemoglobin, **4**, 551 (1980).
86. *Boissel J.-P., Wejcman H., Fabritius H., Cabannes R., Labie D.* Biochim. Biophys. Acta, **670**, 203 (1981).
87. *Böhlen P., Kleeman G. J.* Chromatogr., **205**, 65 (1981).
88. *Schroeder W. A., Shelton J. B., Shelton J. R., Powars D. J.* Chromatogr., **174**, 385 (1979).
89. *Kehl M., Lottspeich F., Henschen A.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **362**, 1661 (1981).
90. *Meek J. L.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **77**, 1632 (1980).
91. *Meek J. L., Rossetti Z. L.* J. Chromatogr., **211**, 15 (1981).
92. *Su S.-J., Grego B., Niven B., Hearn M. T. W.* J. Liq. Chromatogr., **4**, 1745 (1981).
93. *Sasagawa T., Okuyama T., Teller D. C.* J. Chromatogr., **240**, 329 (1982).
94. *Browne C. A., Bennett H. P. J., Solomon S.* Anal. Biochem., **124**, 201 (1982).
95. *Krummen K., Frei R. W.* J. Chromatogr., **132**, 27 (1977).
96. *O'Hare M. J., Nice E. C.* J. Chromatogr., **171**, 209 (1979).
97. *Nice F. C., O'Hare M. J.* J. Chromatogr., **162**, 401 (1979).
98. *Black C., Douglas D. M., Tanzer M. L.* J. Chromatogr., **190**, 393 (1980).
99. *Floor E., Leeman S. E.* Anal. Biochem., **101**, 498 (1980).
100. *Koehn J. A., Canfield R. E.* Anal. Biochem., **116**, 349 (1981).
101. *Grego B., Hearn M. T. W.* Chromatographia, **14**, 589 (1981).
102. *Hearn M. T. W., Grego B. J.* Chromatogr., **218**, 497 (1981).
103. *Hearn M. T. W., Grego B. J.* Chromatogr., **203**, 349 (1981).
104. *Anoscato A. A., Babcock G. F., Nishioka K.* J. Chromatogr., **205**, 179 (1981).
105. *Wehr C. T., Correia L., Abbott S. R.* J. Chromatogr. Sci., **20**, 114 (1982).
106. *Davis T. P., Schoemaker H., Chen A., Yamamura H. I.* Life Sci., **30**, 971 (1982).
107. *Taylor S., Kerlavage A., Nelson N., Weldon S., Zoller M.*, in: M. Elzinga (ed.): Methods in Protein Sequence Analysis, p. 471, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.

108. *L'Italien J. J., Laursen R. A.*, in: Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 383, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
109. *Rivier J. E. J.* *Liqu. Chromatogr.*, **1**, 343 (1978).
110. *Hancock W. S., Bishop C. A., Battersby J. E., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. J.* *Chromatogr.*, **168**, 377 (1979).
111. *Seidah N. G., Chan J. S. D., Mardini G., Benjannet S., Chretien M., Boucher R., Genest J.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **86**, 1002 (1979).
112. *Seidah N. G., Ronthier R., Benjannet S., Lariviere N., Gossard F., Chretien M. J.* *Chromatogr.*, **193**, 291 (1980).
113. *Biedermann K., Montali U., Martin B., Svendzen I., Ottesen M.* *Carlsberg Res. Commun.*, **45**, 225 (1980).
114. *Desiderio D. M., Stein J. L., Cunningham M. D., Sabbatini J. Z. J.* *Chromatogr.*, **195**, 369 (1980).
115. *Hancock W. S., Sparrow J. T. J.* *Chromatogr.*, **206**, 71 (1981).
116. *Tischio J. P., Heteyi N. J.* *Chromatogr.*, **236**, 237 (1982).
117. *Bennett H. P. J., Browne C. A., Goltzman D., Solomon S.*, in: E. Gross, J. Meienhofer (eds.): *Proceedings of the 6. American Peptide Symposium*, p. 121, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA, 1980.
118. *Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S. J.* *Liqu. Chromatogr.*, **3**, 1353 (1980).
119. *Dunlap C. E., Gentleman S., Lowney L. I. J.* *Chromatogr.*, **160**, 191 (1978).
120. *Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S.* *Biochemistry*, **20**, 4530 (1981).
121. *Vale M., Spiess J., Rivier C., Rivier J.* *Science*, **213**, 1394 (1981).
122. *Voskamp D., Olieman C., Beyerman H. C. J.* *Royal Netherlands Chem. Soc.*, **99**, 105 (1980).
123. *McDermott J. R., Smith A. I., Biggins J. A., Al-Noaemi M. C., Edwardson J. A. J.* *Chromatogr.*, **222**, 371 (1981).
124. *Takahashi N., Tetaert D., Putnam F. M.*, in: M. Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 463, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1982.
125. *Barfod M.*, *J. Chromatogr.*, **230**, 289 (1982).
126. *Pande H., Shively J. E.* *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**, 258 (1982).
127. *Loeber J. G., Verhoef J., Burbach J. P. H., Wittar A.* *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **86**, 1288 (1979).
128. *Kratz H., Yang C.-Y., Krusche J. U., Hilschmann N.* *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**, 1591 (1980).
129. *Tonnaer J. A. D. M., Verhoef J., Wiegant V. M., de Jong W. J.* *Chromatogr.*, **183**, 303 (1980).
130. *Currie B. L., Chang J. K., Cooley R. J.* *Liqu. Chromatogr.*, **3**, 513 (1980).
131. *Imoto T., Okazaki K.* *Biochem. J.*, **89**, 437 (1981).
132. *Sugihara J., Imamura T., Imoto T., Yanase T.* *Biochim. Biophys. Acta*, **669**, 105 (1981).
133. *Rubinstein M., Stein S., Udenfriend S.* *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 4969 (1977).
134. *Lewis R. V., Stein S., Udenfriend S.* *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **13**, 493 (1979).
135. *Hughes G. J., Winterhalter K. H., Wilson K. J.* *FEBS Lett.*, **108**, 81 (1979).
136. *Wilson K. J., Honegger A., Stoetzel R. P., Hughes G. J.* *Biochem. J.*, **199**, 31 (1981).
137. *Wilson K. J., Honegger A., Hughes G. J.* *Biochem. J.*, **199**, 43 (1981).
138. *Shively J. E., Pande H., Yuan P.-M., Hawke D.*, in: Elzinga M. (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 447, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
139. *Rubinstein M.* *Anal. Biochem.*, **98**, 1 (1979).
140. *Rubinstein M., Chen-Kiang S., Stein S., Udenfriend S.* *Anal. Biochem.*, **95**, 117 (1979).
141. *Majors R. E. J.* *Chromatogr. Sci.*, **18**, 488 (1980).
142. *Van der Rest M., Bennett H. P. J., Solomon S., Glorieux F. H.* *Biochem. J.*, **191**, 253 (1980).

143. Wilson K. J., van Wieringen E., Klauser S., Berchtold M. W., Hughes G. J. *J. Chromatogr.*, **237**, 407 (1982).
144. Bishop C. A., Meyer L. J., Harding D. R., Hancock W. S., Hearn M. T. W. *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 661 (1981).
145. Hearn M. T. W., Grego B., Bishop C. A. *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 1725 (1981).
146. Bradley W. A., Gotto A. M., Sparrow J. T., in: M. Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 479, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
147. Wellaufer D. B. *Adv. Protein Chem.*, **17**, 320 (1962).
148. Mabichi H., Nakahashi H. *J. Chromatogr.*, **213**, 275 (1981).
149. Rubinstein M., Stein S., Gerber L. D., Udenfriend S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3052 (1977).
150. Nakamura H., Zimmerman C. L., Pisano J. J. *Anal. Biochem.*, **93**, 423 (1979).
151. Gruber K. A., Stein S., Brink L., Radhakrishnan A., Udenfriend S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1314 (1976).
152. Radhakrishnan A. N., Stein S., Licht A., Gruber K. A., Udenfriend S. *J. Chromatogr.*, **132**, 552 (1977).
153. Bohan T. P., Meek J. L. *Neurochem. Res.*, **3**, 367 (1978).
154. Isobe T., Takayasu T., Takai N., Okuyama T. *Anal. Biochem.*, **122**, 417 (1982).
155. Nika H., Hultin T. *Anal. Biochem.*, **98**, 178 (1979).
156. Van der Rest M., Cole W. G., Glorieux F. H. *Biochem. J.*, **161**, 527 (1977).
157. Voelter W., Bauer H., Fuchs S., Pietrzik E. *J. Chromatogr.*, **153**, 433 (1978).
158. Isobe T., Ishioka N., Okuyama T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **102**, 279 (1981).
159. Takahashi N., Isobe T., Kasai H., Seta K., Okuyama T. *Anal. Biochem.*, **115**, 181 (1981).
160. Dizdaroğlu M., Simic M. G. *J. Chromatogr.*, **195**, 119 (1980).
161. Larsen B., Viswanatha V., Chang S. Y., Hruby V. J. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 207 (1978).
162. Lundanes E., Greibrokk T. *J. Chromatogr.*, **149**, 241 (1978).
163. Larsen B., Fox B. L., Burke M. F., Hruby V. J. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **13**, 12 (1979).
164. Hunter C., Sugden K., Lloyd-Jones J. G. J. *Liqu. Chromatogr.*, **3**, 1135 (1980).
165. Chang J.-Y. *Biochem. J.*, **199**, 537 (1981).
166. Chang J.-Y., Knecht R., Ball R., Alkan S. S., Braun D. G. *Eur. J. Biochem.*, **127**, 625 (1982).
167. Yu T. J., Schwartz H., Giese R. W., Karger B. L., Vouros P. *J. Chromatogr.*, **218**, 519 (1981).
168. Hancock W. S., Bishop C. A., Presridge R. L., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. *J. Chromatogr.*, **153**, 391 (1978).
169. Widmer F., Breddam K., Johansen J. T. *Carlsberg Res. Comm.*, **45**, 453 (1980).
170. Utyashin V. V., Deigin V. I., Ivanov V. T., Ouchnikov Yu. A. *J. Chromatogr.*, **215**, 263 (1981).
171. Ling N., Burgus R., Guillemin R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3942 (1976).
172. Hansen J. J., Greibrokk T., Currue B. L., Johansson K. N., Folkers K. *J. Chromatogr.*, **135**, 155 (1977).
173. Frei R. W., Michel L., Santi W. J. *J. Chromatogr.*, **126**, 665 (1976).
174. Hancock W. S., Bishop C. A., Hearn M. T. W. *FEBS Lett.*, **72**, 139 (1976).
175. Krummen K., Frei R. W. *J. Chromatogr.*, **132**, 429 (1977).
176. Bennett H. P. J., Hudson A. M., McMartin C., Purdon G. E. *Biochem. J.*, **168**, 9 (1977).
177. Mönch W., Dehnen W. *J. Chromatogr.*, **140**, 260 (1977).

178. *Hancock W. S., Bishop C. A., Meyer L. J., Harding D. R. K., Hearn M. T. W.* J. Chromatogr., **161**, 291 (1978).
179. *Gentleman S., Lowney L. I., Cox B. M., Goldstein A. J.* Chromatogr., **153**, 274 (1978).
180. *Burgus R., Rivier J.*, in: A. Loffer (ed.): *Peptides 1976*, p. 85, Univ. Brüssel, Belgium, 1976.
181. *Bennett H. P. J., Hudson A. M., Kelly L., McMartin C., Purdon G. E.* Biochem. J., **175**, 1139 (1978).
182. *Gianoulakis C., Seidah N. G., Routhier R., Chretien M. J.* Biol. Chem., **254**, 11903 (1979).
183. *Pedigo N. W., Ling N. C., Reisine T. D., Yamamura H. I.* Life Sci., **24**, 1645 (1979).
184. *Hearn M. T. W., Grego B., Hancock W. S.* J. Chromatogr., **185**, 429 (1979).
185. *Spieess J., Rivier J. E., Rodkey J. A., Bennett C. D., Vale W.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 2974 (1979).
186. *Meienhofer J., Gabriel T. F., Michalewsky J., Li C. H.*, in: J. Z. Siemon, and G. Kupryszewski (eds.): *Peptides 1978*, p. 243, Wroslaw University Press, Poland, 1978.
187. *Martinelli R. A., Scheraga H. A.* Anal. Biochem., **96**, 246 (1979).
188. *Gerber G. E., Anderegg R. J., Herlihy W. C., Gray C. P., Biemann K., Khorana H. G.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 227 (1979).
189. *Terabe S., Konaka R., Inouye K. J.* Chromatogr., **172**, 163 (1979).
190. *Diamond M. E. F., Sipman W. A., Olive J. J.* Ligu. Chromatogr., **2**, 1407 (1979).
191. *Stoming T. A., Garver F. A., Gangarosa M. A., Harrison J. M., Huisman T. H. J.* Anal. Biochem., **96**, 113 (1979).
192. *Kimura S., Lewis R. V., Gerber L. D., Brink L., Rubinstein M., Stein S., Udenfriend S.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1756 (1979).
193. *Chaiken I. M., Hough C. J.* Anal. Biochem., **107**, 11 (1980).
194. *Abrahamsson M., Grönningsson K. J.* Ligu. Chromatogr., **3**, 495 (1980).
195. *Lariviere N., Seidah N. G., de Serres G., Rochemont J., Chretien M.* FEBS Lett., **122**, 279 (1980).
196. *Pradayrol L., Jörnvall H., Mutt V., Ribet A.* FEBS Lett., **109**, 55 (1980).
197. *Schlabach T. D., Fulton J. A., Mockridge P. B., Toren E. C.* Clin. Chem., **26**, 707 (1980).
198. *Maurer R. J.* Biochem. Biophys. Meth., **2**, 183 (1980).
199. *Seidah N. G., Dennis M., Corvol P., Rochemont J., Chretien M.* Anal. Biochem., **109**, 185 (1980).
200. *Lebl M.* Coll. Czechoslov. Chem. Comm., **45**, 2927 (1980).
201. *Breddam K., Widmer F., Johansen J. T.* Carlsberg Res. Comm., **45**, 237 (1980).
202. *Sharp B., Pekary A. E., Meyer N. V., Hershman J. M.* Biochem. Biophys. Res. Comm., **95**, 618 (1980).
203. *Krummen K. J.* Ligu. Chromatogr., **3**, 1243 (1980).
204. *Kinkel J. F. M., Heuwer G., Kraak J. C.* Chromatographia, **13**, 145 (1980).
205. *Lindeberg G.* J. Chromatogr., **193**, 427 (1980).
206. *Pearson D., Shively J. E., Clark B. R., Geschwind I. J., Barkley M., Nishioka R. S., Bern H. A.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5021 (1980).
207. *Takagaki Y., Gerber G. E., Nihei K., Khorana H. G. J.* Biol. Chem., **255**, 1536 (1980).
208. *Benjannet S., Seidah N. G., Routhier R., Chretien M.* Nature, **285**, 415 (1980).
209. *Grego B., Hearn M. T. W.* Proc. Univ. Otago Med. Sch., **58**, 41 (1980).
210. *Wilson K. J.* Chimia, **34**, 469 (1980).
211. *Verhoef J., Loeber J. G., Burbach J. P. H., Gispens W. H., Witter A., de Wied D.* Life Sci., **26**, 851 (1980).
212. *Böhlen P., Castillo F., Ling N., Guillemin R.* Int. J. Pept. Prot. Res., **16**, 306 (1980).

213. Hearn M. T. W. *J. Liq. Chromatogr.*, **3**, 1255 (1980).
214. Swann R. W., Li C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 230 (1980).
215. Knight M., Ito Y., Chase T. W. *J. Chromatogr.*, **212**, 356 (1981).
216. Desiderio D. M., Yamada S., Tanzer F. S., Horton J., Trimble J. J. *Chromatogr.*, **217**, 437 (1981).
217. Gozzini L., Montecucchi P. C. *J. Chromatogr.*, **216**, 355 (1981).
218. Hancock W. S., Capra J. D., Bradley W. A., Sparrow J. T. *J. Chromatogr.*, **206**, 59 (1981).
219. Spindel E., Pettibone D., Fisher L., Farnstrom J., Wurtman R. J. *Chromatogr.*, **222**, 381 (1981).
220. Seidah N. G., Benjannet S., Chretien M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **100**, 901 (1981).
221. Wilson K. J., Hughes G. J. *Chimia*, **35**, 327 (1981).
222. Olieman C., Sedlick E., Voskamp D. J. *Chromatogr.*, **207**, 421 (1981).
223. Richter W. O., Weisweiler P., Schwandt P. J. *Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 812 (1981).
224. Crawhall J. C., Posner B. J. *Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **19**, 641 (1981).
225. Haeffner-Gormley L., Poludniak N. H., Wetlaufer D. B. *J. Chromatogr.*, **214**, 185 (1981).
226. Sellers J. P., Clark H. G. *Thromb. Res.*, **23**, 91 (1981).
227. Gay D. D., Lakhti R. A. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **18**, 107 (1981).
228. Mais D. E., Lahr P. D., Bosin T. R. *J. Chromatogr.*, **225**, 27 (1981).
229. Kemp M. C., Hollaway W. L., Prestidge R. L., Bennett J. C., Compans R. W. *J. Liq. Chromatogr.*, **4**, 587 (1981).
230. Oray B., Jahani M., Gracy R. W. *Anal. Biochem.*, **125**, 131 (1982).
231. Mabuchi H., Nakahashi H. *J. Chromatogr.*, **228**, 292 (1982).
232. Fransson B., Ragnarsson U., Zetterqvist Ö. *Anal. Biochem.*, **126**, 174 (1982).
233. Schneider H.-J., Illig U., Müller E., Linzen B., Lottspeich F., Henschen A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 487 (1982).
234. Riley C. M., Sternson L. A., Repta A. J. *Anal. Biochem.*, **124**, 167 (1982).
235. Angwin P., Barchas J. D. *J. Chromatogr.*, **231**, 173 (1982).
236. O'Farrell P. J. *Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975).
237. Lebl M. *J. Chromatogr.*, **242**, 342 (1982).
238. Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. *Nature*, **296**, 659 (1982).
239. Mönch W., Dehnen W. *J. Chromatogr.*, **147**, 415 (1978).
240. Congote L. F., Bennett H. P. J., Solomon S. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **89**, 851 (1979).
241. Mahoney W. C., Hermodson M. A. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11199 (1980).
242. Henderson L., Sowder R., Oroszlan S., in: M. Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 409, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
243. Henderson L. E., Sowder R., Oroszlan S., in: Liu, Schechter, Henrikson, and Condlife (eds.): *Chemical Synthesis and Sequencing of Peptides and Proteins*, p. 251, Elsevier, North Holland, 1981.
244. Van der Rest M., Fietzek P. *Eur. J. Biochem.*, **125**, 419 (1982).
245. Pearson J. D., Lin N. T., Regnier F. E. *Anal. Biochem.*, **124**, 217 (1982).
246. Kehl M., Lottspeich F., Henschen A. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**, 1501 (1982).
247. Lewis R. V., Fallon A., Stein S., Gibson K. D., Udenfriend S. *Anal. Biochem.*, **104**, 153 (1980).
248. Vanecek G., Regnier F. E. *Anal. Biochem.*, **121**, 156 (1982).
249. Pearson J. D., Mahoney W. C., Hermodson M. A., Regnier F. E. *J. Chromatogr.*, **207**, 325 (1981).
250. Titani K., Sasagawa T., Resing K., Walsh K. A. *Anal. Biochem.*, **123**, 408 (1982).
251. Friesen H.-J., Stein S., Evinger M., Familletti P. C., Moschera J., Meienhofer J., Shively J., Pestka S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 432 (1981).

252. Jones B. N., Lewis R. V., Pääbo S., Kojima K., Kimura S., Stein S. J. *Liqu. Chromatogr.*, **3**, 1373 (1980).
253. Green M., Breckmann K. H. *Anal. Biochem.*, **124**, 209 (1982).
254. Fallon A., Lewis R. V., Gibson K. D. *Anal. Biochem.*, **110**, 318 (1981).
255. Klee C. B., Oldewurtel M. D., Williams J. F., Lee J. W. *Biochem. Int.*, **2**, 485 (1981).
256. Schwandt P., Richter W. O., Weisweiler P. J. *Chromatogr.*, **225**, 185 (1981).
257. Barford R. A., Sliwinski B. J., Breyer A. C., Rothbart H. L. *J. Chromatogr.*, **235**, 281 (1982).
258. Schwandt P., Richter W. O., Reuschel-Janetschek E. J. *Neurochem.*, **39**, 357 (1982).
259. Shintizu K., Wilson J. B., Huisman T. H. J. *Hemoglobin*, **4**, 487 (1980).
260. Wilson K. J., Berchtold M. W., Zumstein P., Klausner S., Hughes G. J., in: M. Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 401, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
261. Certa U., von Ehrenstein G. *Anal. Biochem.*, **118**, 147 (1981).
262. Rubinstein M., Rubinstein S., Familletti P. C., Miller R. S., Waldman A. A. *Pestka S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 640 (1979).
263. Barth H. G. *Anal. Biochem.*, **124**, 191 (1982).
264. McKean D. J., Bell M., in: M. Elzinga (ed.): *Methods in Protein Sequence Analysis*, p. 417, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
265. Strickler M. P., Gemski M. J., Doctor B. P. *J. Liqu. Chromatogr.*, **4**, 1765 (1981).
266. Regnier F. E., Gooding K. M. *Anal. Biochem.*, **103**, 1 (1980).
267. Regnier F. E. *Anal. Biochem.*, **126**, 1 (1982).
268. Vacik D. N., Toren E. C. *J. Chromatogr.*, **228**, 1 (1982).
269. Mikes O., Strop P., Zbrozek J., Coupek J. *J. Chromatogr.*, **119**, 339 (1976).
270. Chang S. H., Noel R., Regnier F. E. *Anal. Chem.*, **48**, 1839 (1976).
271. Chang S. H., Gooding K. M., Regnier F. E. *J. Chromatogr.*, **125**, 103 (1976).
272. Kudirka P. J., Schroeder R. R., Hewitt T. E., Toren E. C. *Clin. Chem.*, **22**, 471 (1976).
273. Schlabach T. D., Alpert A. J., Regnier F. E. *Clin. Chem.*, **24**, 1351 (1978).
274. Bostick W. D., Denton M. S., Dinsmore S. R. *Clin. Chem.*, **26**, 712 (1980).
275. Gooding K. M., Lu K.-C., Regnier F. E. *J. Chromatogr.*, **164**, 506 (1979).
276. Hanash S. M., Shapiro D. N. *Hemoglobin*, **5**, 165 (1981).
277. Gooding D. L., Charfield C., Coffin B. *Am. Lab.*, August 1980, 48.
278. Vanecek G., Regnier F. E. *Anal. Biochem.*, **109**, 345 (1980).
279. Ott G. S., Shore V. G. *J. Chromatogr.*, **231**, 1 (1982).
280. Schlabach T. D., Abbott S. R. *Clin. Chem.*, **26**, 1504 (1980).
281. Frolik C. A., Dart L. L., Sporn M. B. *Anal. Biochem.*, **125**, 203 (1982).
282. Van der Wal S., Huber J. F. K. *Anal. Biochem.*, **105**, 219 (1980).
283. Mikes O. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **14**, 393 (1979).
284. Mikes O., Strop P., Zbrozek J., Coupek J. *J. Chromatogr.*, **119**, 339 (1976).
285. Mikes O., Strop P., Sedlackova J. *J. Chromatogr.*, **148**, 237 (1978).
286. Cole R. A., Soeldner J. S., Dunn P. J., Bunn H. F. *Metabolism*, **27**, 289 (1978).
287. Schlabach T. D., Fulton J. A., Mockridge P. B., Toren E. C. *Clin. Chem.*, **25**, 1600 (1979).
288. Schlabach T. D., Fulton J. A., Mockridge P. B., Toren E. C. *Anal. Chem.*, **52**, 729 (1980).
289. Denton M. S., Bostick W. D., Dinsmore S. R., Mrochek J. E. *Clin. Chem.*, **24**, 1406 (1978).
290. Schlabach T. D., Chang S. H., Gooding K. M., Regnier F. E. *J. Chromatogr.*, **134**, 91 (1977).
291. Bostick W. D., Dinsmore S. R., Mrochek J. E., Waalkes T. P. *Clin. Chem.*, **24**, 1305 (1978).
292. Bissett F. H. *J. Chromatogr.*, **178**, 515 (1979).

293. Lu K.-C., Gooding K. M., Regnier F. E. Clin. Chem., **25**, 1608 (1979).
294. Kotake A. N., Funae Y. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 6473 (1980).
295. Cruber C. A., Koets M. D. Clin. Chem., **25**, 1970 (1979).
296. Abraham E. C., Cope N. D., Brazier N. N., Huisman T. H. J. Biochem. Biophys. Acta, **577**, 159 (1979).
297. Radhakrishnan A. N., Skin S., Licht A., Gruber K. A., Udenfried S. J. Chromatogr., **132**, 552 (1977).
298. Rudolph F. B., Clark S. W. Anal. Biochem., **127**, 193 (1982).
299. Gozzini L., Montecucchi P. C., in: F. Lottspeich, A. Henschen, and K. P. Hupe (eds.): High Performance Liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 349, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
300. Brantl V., in F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High Performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 365, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
301. Engelhardt H., Ahr G., Hearn M. T. W. J. Ligu. Chromatogr., **4**, 1361 (1981).
302. Fukano K., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **166**, 47 (1978).
303. Kato Y., Komiya K., Sawada Y., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **190**, 305 (1980).
304. Someno T., Katoh K., Niiijima K., Miyazaki H. J. Chromatogr., **188**, 185 (1980).
305. Von Bahl-Lindström H., Carlquist M., Mutt V., Jörnvall H., in: M. Elzinga (ed.): Methods in Protein Sequence Analysis, p. 455, Humana Press Clifton, New Jersey, 1982.
306. Somack R., McKay V. S., Giles J. W. J. Am. Chem. Soc., **16**, 285 (1980).
307. Dimenna G. P., Segall H. J. J. Ligu. Chromatogr., **4**, 639 (1981).
308. Calam D. H., Davidson J. J. Chromatogr., **218**, 581 (1981).
309. Tomono T., Yoshida S., Tokunaga E. J. Polymer. Sci., **17**, 335 (1979).
310. Toste A. P. J. Chromatogr., **197**, 207 (1980).
311. Suzuki K. T., Motomura T., Tsuchiya Y., Yamamura M. Anal. Biochem., **107**, 75 (1980).
312. Keshavarz E., Nakai S. Biochim. Biophys. Acta, **576**, 269 (1977).
313. Rokushika S., Okawa T., Hatano H. J. Chromatogr., **176**, 456 (1979).
314. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **190**, 297 (1980).
315. Wehr C. T., Abbott S. R. J. Chromatogr., **185**, 453 (1979).
316. Himmel M. E., Squire P. G. J. Pept. Prot. Res., **17**, 365 (1981).
317. Ratge D., Wisser H. J. Chromatogr., **230**, 47 (1982).
318. Okazaki M., Hagiwara N., Hara I. J. Biochem., **92**, 517 (1982).
319. Bushee D. L., Payne D. M., Jasheway D. W., Carlisle S., Lacko A. G. Clin. Chem., **27**, 2052 (1981).
320. Jenik R. A., Porter J. W. Anal. Biochem., **111**, 184 (1981).
321. Ui N. Anal. Biochem., **97**, 65 (1979).
322. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **193**, 458 (1980).
323. Ui N. J. Chromatogr., **215**, 289 (1981).
324. Osumi T., Hashimoto T., Ui N. J. Biochem., **87**, 1735 (1980).
325. Kehl M., Henschen A., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High Performance Liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 339, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
326. Pönstingl H., Kraus E., Little M., Kempf T., Hofer-Warbinek R., Ade W., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 325, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
327. Imamura T., Konishi K., Yokoyama M. J. Biochem., **86**, 639 (1979).
328. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **193**, 29 (1980).

329. Takagi T. J. Chromatogr., **219**, 123 (1981).
330. Konishi T. Methods Enzymol., **88**, 202 (1982).
331. Konishi T., Sasaki M. Chem. Pharm. Bull., **30**, 4208 (1982).
332. Takagi K., Takeda K., Okuno T. J. Chromatogr., **208**, 201 (1981).
333. Bergmeyer H., Straub J., Oesterheld D., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 315, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1981.
334. Lemke H. D., Oesterheld D., in: E. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 307, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1981.
335. Shioya Y., Yoshida H., Nakajima T., in: Yonehara (ed.): Peptide Chemistry, p. 127, Protein Research Foundation, Osaka, 1980.
336. Kojima K., Manabe T., Okuyama T., Tomono T., Suzuki T., Tokunaga E. J. Chromatogr., **239**, 565 (1982).
337. Williams C. H., Jr., Arscott L. D., Swonsorr R. P., Massey V., Schirmer R. H., Schulz G. E., Untucht-Grau R., in: Lottspeich F., A. Henschen and K. P. Hupe (eds.): High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, p. 293, Walter de Gruyter, Berlin-New York, 1981.
338. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. HRC and CC, **3**, 145 (1980).
339. Someno T., Katoh K., Niijima K., Miyazaki H. J. Chromatogr., **253**, 81 (1982).
340. Feste A., Gan J. C. J. Chromatogr., **248**, 417 (1982).
341. Stüber K., Bayreuther K., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (Eds.): High performance liquid chromatography in protein and peptide chemistry, p. 205, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
342. Suzuki K. T. Anal. Biochem., **102**, 31 (1980).
343. Hughes G. J., Winterhalter K. H., Wilson K. J., in: F. Lottspeich, A. Henschen, and K. P. Hupe (Eds.): High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, p. 175, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
344. Flatmark T., Gronberg M. Biochem. Biophys. Res. Comm., **99**, 292 (1981).
345. Von Bahr-Lindström H., Moberg U., Sjö Dahl J., Jönvall H. Biosci. Rep., **2**, 803 (1982).
346. Hashimoto T., Sasaki H., Aiura M., Kato K. J. Chromatogr., **160**, 301 (1978).
347. Kato Y., Komiya K., Sasaki H., Hashimoto T. J. Chromatogr., **193**, 311 (1980).
348. Hara I., Shiraishi K., Okazaki M. J. Chromatogr., **239**, 549 (1982).
349. Okazaki M., Ohno Y., Hara I. J. Chromatogr., **221**, 257 (1980).
350. Ohno Y., Okazaki M., Hara I. J. Biochem., **89**, 1675 (1981).
351. Germershausen J., Karkas J. D. Biochem. Biophys. Res. Comm., **99**, 1020 (1981).
352. Rittinghaus K., Franzen K.-H. Fresenius Z. Anal. Chem., **301**, 144 (1980).
353. Hefti F. Anal. Biochem., **121**, 378 (1982).
354. Robinson N. C., Talbert L. Biochem. Biophys. Res. Comm., **95**, 90 (1980).
355. Dayer J. M., Stephenson M. L., Schmidt E., Karge W., Krane S. M. FEBS Lett., **124**, 253 (1981).
356. Gruber K. A., Whitaker J. M., Morris M. Anal. Biochem., **97**, 176 (1979).
357. Rittinghaus K., Franzen K.-H., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High Performance Liquid Chromatography in Protein and Peptide Chemistry, p. 83, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
358. Roumeliotis P., Unger K. K., Kinkel J., Brunner G., Wieser R., Tschank G., in: F. Lottspeich, A. Henschen, K. P. Hupe (eds.): High Performance Liquid Chromatography in protein and peptide chemistry, p. 71, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981.
359. Kopaciewicz W., Regnier F. E. Anal. Biochem., **125**, 8 (1982).
360. Schwarz W., Tiedemann H., Tiedemann H. Molec. Biol. Rep., **8** 7 (1981).

361. *Sebille B., Thuaud N., Tillement J.-P.* J. Chromatogr., **167**, 159 (1978).
362. *Roumeliotis P., Unger K. K.* J. Chromatogr., **185**, 445 (1979).
363. *Schmidt D. E., Giese R. W., Conron D., Karger B. L.* Anal. Chem., **52**, 177 (1980).
364. *Ohlson S., Hansson L., Larsson P. O., Mosbach K.* FEBS Lett., **93**, 5 (1978).
365. *Sportsman J. R., Wilson G. S.* Anal. Chem., **52**, 2013 (1980).
366. *Löbermann H., Lottspeich F., Bode W., Huber R.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **363**, 1377 (1982).
367. *Kano S., Matsumoto K., Nakamura H., Hashimoto T.* J. Clin. Chem. Clin. Biochem., **19**, 723 (1981).
368. *Bertolini M. J.* Vox Sang., **43**, 87 (1982).
369. *Weiner S. J.* Chromatogr., **245**, 148 (1982).
370. *Van der Zee R., Welling G. W.* J. Chromatogr., **244**, 134 (1982).
371. *Gazdag M., Szepesi G.* J. Chromatogr., **218**, 603 (1981).
372. *Catherwood B. D., Defos L. J.* Calcif. Tissue Int., **31**, 86 (1980).
373. *Borman S. A.* Anal. Chem., **54**, 21 A (1982).
374. *Congote L. F.* Blood, **57**, 353 (1981).
375. *Hinman C. L., Rauch H. C., Pfeifer R. F.* Life Sci., **30**, 989 (1982).
376. *Nice E. C., Capp M., O'Hara M. J.* J. Chromatogr., **185**, 413 (1979).
377. *Schwandt P., Richter W. O.* Biochim. Biophys. Acta, **626**, 376 (1980).
378. *Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge P. L., Harding D. R. K., Hearn M. T. W.* Science, **200**, 1168 (1978).
379. *Petrides P. E., Jones R. T., Böhlen P.* Anal. Biochem., **105**, 383 (1980).
380. *Tarabe S., Nishi H., Ando T.* J. Chromatogr., **212**, 295 (1981).
381. *Seta K., Washitake M., Anmo T., Takai N., Okuyama T.* J. Liqu. Chromatogr., **4**, 129 (1981).
382. *Richter W., Schwandt P.* J. Neurochem., **36**, 1279 (1981).
383. *Glaser R. A.* J. Chromatogr., **145**, 469 (1978).
384. *Shelton J. B., Shelton J. R., Schroeder W. A.* J. Liqu. Chromatogr., **4**, 1381 (1981).
385. *Burger D. R., Vandenbark A. A., Dunnick W., Kraybill W., Daves G. D., Vetto R. M.* J. Immunol., **122**, 1091 (1979).
386. *Kimmura M., Itokawa Y.* J. Chromatogr., **211**, 290 (1981).
387. *Menard L., Dempsey M. E., Blankstein L. A., Aleyassine H., Wacks M., Sceldner J. S.* Clin. Chem., **26**, 1598 (1980).
388. *Hayes E. J., Gleason R. E., Soeldner J. S., Wacks M., Blankstein L.* Clin. Chem., **27**, 476 (1981).
389. *Persiani C., Cukor P., French K. J.* Chromatogr. Sci., **14**, 417 (1976).
390. *Crone H. D., Dawson R. M. J.* Chromatogr., **129**, 91 (1976).
391. *Blagrove R. J., Frenkel M. J.* J. Chromatogr., **132**, 399 (1977).
392. *Hara I., Okazaki M., Onho Y.* J. Biochem., **87**, 1863 (1980).
393. *Murofushi H.* J. Biochem., **87**, 979 (1980).
394. *Takagi T.* J. Biochem., **89**, 363 (1981).
395. *Nishida E., Kuwaki T., Maekawa S., Sakai H.* J. Biochem., **89**, 1655 (1981).
396. *Smith A. I., McDermott J. R.* Regulatory Peptides, **4**, 6 (1982).
397. *Rubinstein M., Levy W. P., Moschera J. A., Lai C.-Y., Hershberg R. D., Bartlett R. T., Pesika S.* Arch. Biochem. Biophys., **210**, 307 (1981).
398. *Rivier J., Rivier G., Spiess J., Vale W.* Anal. Biochem., **127**, 258 (1982).
399. *Verhoef J., Codd E. E., Burbach J. P. H., Witter A. J.* Chromatogr., **233**, 317 (1982).
400. *Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.* J. Chromatogr., **253**, 219 (1982).
401. *Heukeshoven J., Dernick R., Hashimoto T.* J. Chromatogr., **252**, 241 (1982).
402. *Aoshima H.* Anal. Biochem., **95**, 371 (1979).
403. *Kato Y., Nakamura K., Hashimoto T.* J. Chromatogr., **245**, 193 (1982).
404. *Pfannkoch E., Lu K. C., Regnier F. E., Barth H. J.* Chromatogr. Sci., **18**, 430 (1980).
405. *Kaneda N., Sato M., Yagi K.* Anal. Biochem., **127**, 49 (1982).

406. *Josic Dj., Reutter W., Molnar I.*, in: I. Molnar (ed.): Practical Aspects of Modern HPLC, p. 109, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1982.
407. *Schwarz W., Born J., Tiedemann H., Molnar I.*, in: I. Molnar (ed.): Practical Aspects of Modern HPLC, p. 123, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1982.
408. *Kehl M., Lottspeich F., Henschen A.*, in I. Molnar (ed.): Practical Aspects of Modern HPLC, p. 137, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1982.
409. *Ritschmann M., Kuehn L., Dahlmann B., Reinsuer H.* Anal. Biochem., 124, 134 (1982).
410. *Hara S., Ohsawa S., Dobashi A. J.* Liqu. Chromatogr., 4, 409 (1981).
411. *Buchholz K., Borchert A., Kasche S. V.*, in: I. Molnar (ed.): Practical Aspects of Modern HPLC, p. 187, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1982.
412. *Griffin M., Wilson J., Lorand L.* Anal. Biochem., 124, 406 (1982).
413. *Mahoney W. C.* Biochim. Biophys. Acta, 704, 284 (1982).
414. *Kosow D. P., Morris S., Orther C. L., Rhee M.-J.* Anal. Biochem., 126, 425 (1982).
415. *Kato Y., Komiya K., Hishimoto T. J.* Chromatogr., 246, 13 (1982).
416. *Lewis R. V., DeWald D. J.* Liqu. Chromatogr., 5, 1367 (1982).
417. *Fulton J. A., Schlabach T. D., Kerl J. E., Toren E. C. J.* Chromatogr., 175, 283 (1979).
418. *Alpert A. J., Regnier F. E. J.* Chromatogr., 185, 375 (1979).

Пептидные гормоны

В. Вёльтер (W. Voelter)

5.1. Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография — это современная методика, позволяющая химику, исследующему пептидные гормоны, проводить их быстрое разделение, очистку и структурный анализ.

5.2. Принципы разделения

5.2.1. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)

ОФ-ВЭЖХ представляет особый интерес для исследователей пептидных гормонов, что объясняется наличием большого числа доступных колонок, отличающихся высокой эффективностью, прекрасной селективностью и устойчивостью к действию давления, быстро переуравновешиваемых и редко дающих протечки; неподвижные фазы, используемые в таких колонках, устойчивы к действию органических растворителей и слабых кислот. Обращенные неподвижные фазы, пригодные для разделения пептидных гормонов, выпускаются многими фирмами. К числу таких фаз относятся: биорад ODS (наиболее пригоден для разделения гидрофильных пептидов), μ -бондапак алкил-фенил, μ -бондапак C_{18} , μ -бондапак цианопропил (наиболее пригоден для разделения гидрофильных пептидов), C_{18} -корасил, C_{18} -LP-1, гиперсил ODS, лихросорб C_2 , лихросорб диол, лихросорб C_8 , лихросорб C_{18} (пригоден для разделения гидрофильных пептидов), нуклеосил C_8 , нуклеосил C_{18} , нуклеосил 5CN и партисил ODS-1 (пригодны для разделения гидрофобных пептидов), партисил ODS-2 (пригоден для разделения гидрофильных пептидов), партисил-10-(валин-аланин-пролин), партисил-10-(валин-фенилаланин-пролин), фенил-Sil-X-1, порагель PN, порагель PS, силикагель-CT-(валин-аланин-серин), силикагель-диамин, сферисорб ODS, зорбакс C-8 или зорбакс ODS (пригодны для разделения гидрофильных пептидов).

При разделении пептидов или пептидных гормонов методом ОФ-ВЭЖХ в качестве подвижной фазы используются водные

Таблица 5.1. Время удерживания 25 пептидов и пептидных гормонов при разделении методом ВЭЖХ^а [15]

Соединение	Время удерживания, мин		Соединение	Время удерживания, мин	
	pH 7,4	pH 2,1		pH 7,4	pH 2,1
1. Триглицин	2,0	3,0	14. Церулеин	34,2	42,2
2. Пентааланин	4,6	8,1	15. Окситоцин	36,4	37,9
3. Дивалин	6,9	14,5	16. Гастрин-(12-15)	36,5	42,4
4. Диметионин	10,5	21,0	17. Нейротензин	39,0	48,0
5. Рилизинг-фактор тиреотропина	11,5	11,2	18. Физаламин	41,0	43,0
6. Тафцин	11,7	12,0	19. Трифенилаланин	41,6	49,5
7. Тритиروزин	19,5	29,7	20. Рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона	42,8	49,5
8. (Met)-Энкефалин	27,5	38,0	21. α -Меланотропин	46,2	46,2
9. Трилейцин	28,0	36,8	22. Брадикинин	48,0	45,0
10. (Leu)-Энкефалин	29,3	42,0	23. Эледонзин	53,0	44,0
11. Дитриптофан	31,6	44,3	24. Глюкагон	53,6	60,0
12. Ангиотензин II	32,2	47,5	25. Соматостатин	57,5	55,0
13. α -Эндорфин	32,3	47,7			

^а Условия разделения. Неподвижная фаза: биорад ODS; элюент: А — 0,1 М NaClO₄ (pH 7,4 и 2,1), Б — ацетонитрил, градиентное элюирование от 0 до 60% Б в течение 80 мин, 0,75%/мин; температура: комнатная. При pH 7,4 в исходный буферный раствор вводят 5 мМ фосфатный буфер, при pH 2,1 — 0,1% фосфорной кислоты.

растворы, например H₃PO₄ [1], фосфатные буферные растворы [2, 3], раствор фосфата триэтиламмония [4, 5], HClO₄ [6], HCl [7], CH₃COOH [7], CF₃COOH [8], NH₄OOCCH₃ [9—11] или NH₄HCO₃ [12], которые обычно смешиваются с растворимыми в воде органическими растворителями, увеличивающими элюирующую силу подвижной фазы, например метанолом, уксусной кислотой, этанолом, ацетонитрилом, 2-пропанолом, диметилформамидом, ацетоном, *n*-пропанолом и диоксаном. Как правило, добавление 10% органического растворителя снижает коэффициент емкости *k* в 2—3 раза [13]. Согласно данным работы [14], степень удерживания небольших пептидов и пептидных гормонов коррелирует с их суммарной степенью гидрофобности (определенной из константы распределения в системе октанол/вода) для большинства гидрофобных аминокислотных остатков пептида. Поскольку весьма часто имеют место различия между предсказанными и экспериментальными значениями коэффициентов удерживания, автор работы [15] определил их для аминокислот, пептидов и пептидных гормонов непосредственно из данных, полученных методом ВЭЖХ. Коэффициенты удерживания аминокислотных остатков были рассчитаны, исходя из времени удерживания 25 пептидов и пептидных гормонов. Хроматографирование было осуществлено на колонке с

Таблица 5.2. Рассчитанные коэффициенты удерживания аминокислотных остатков^a [15]

Аминокислота (N ^b)	Коэффициент удерживания		Аминокислота (N ^b)	Коэффициент удерживания	
	pH 7,4	pH 2,1		pH 7,4	pH 2,1
Триптофан (7)	14,9	18,1	Лизин (8)	0,1	-3,2
Фенилаланин (13)	13,2	13,9	Серин (6)	1,2	-3,7
Изолейцин (4)	13,9	11,8	Аспарагин (5)	0,8	-1,6
Лейцин (9)	8,8	10,0	Глутамин (4)	-4,8	-2,5
Тирозин (11)	6,1	8,2	Аспарагиновая кислота (5)	-8,2	-2,8
Метионин (9)	4,8	7,1	Глутаминовая кислота (3)	-16,9	-7,5
Валин (5)	2,7	3,3	Амино- (19)	2,4	-0,4
Пролин (10)	6,1	8,0	-COOH (17)	-3,0	6,9
Треонин (5)	2,7	1,5	Амидо- (8)	7,8	5,0
Аргинин (7)	0,8	-4,5	Пироглутамино- (5)	-1,1	-2,8
Алаин (4)	0,5	-0,1	Ацетил- (1)	5,6	3,9
Глицин (13)	0,0	-0,5	Тирозинсульфат (1)	10,9	6,5
Гистидин (5)	-3,5	0,8			
Цистин (2)	-6,8	-2,2			

^a Время удерживания пептидов определено в условиях, приведенных в табл. 5.1.^b Число пептидов, использованных для расчета (табл. 5.1).

биорадом ODS при комнатной температуре и элюировании в линейном градиентом режиме от 0,1 М NaClO₄, pH 7,4 и 2,1 в начальный момент до 60% ацетонитрила/0,1 М NaClO₄ спустя 80 мин (табл. 5.1). Как уже было сказано выше, коэффициенты удерживания аминокислотных остатков были рассчитаны исходя из полученных таким образом данных. Для этого была использована программа для компьютера, которая последовательно изменяла коэффициенты удерживания аминокислотных остатков, добиваясь максимальной корреляции между реальным и предсказанным временем удерживания (табл. 5.2). В результате суммирования коэффициентов удерживания, приведенных в табл. 5.2, и последующего прибавления к результату t_0 (2 мин) было получено время удерживания ряда пептидов и пептидных гормонов. Как показывает табл. 5.3, предсказанные и экспериментально найденные значения времени удерживания достаточно близки.

5.2.2. Ионообменная хроматография

Аминокислоты, небольшие пептиды и пептидные гормоны (содержащие менее 30 аминокислотных остатков) хорошо разделяются методом ВЭЖХ на таких неподвижных фазах, у которых ионогенные функциональные группы химически привиты к по-

Таблица 5.3. Сравнение рассчитанных и экспериментально установленных величин времени удерживания^a [15]

Соединение	Время удерживания, мин		Соединение	Время удерживания, мин	
	рас-считанное	экспе-риментальное		рас-считанное	экспе-риментальное
(Met)-энкефалин	18,4	19,0	Вещество Р	33,3	29,0
(Leu)-энкефалин	20,9	22,0	α -MSH	27,3	26,0
АСТН-(5-10)	11,9	17,0	Нейротензин	28,9	24,5
АСТН-(34-39)	27,0	31,0	Соматостатин	25,5	32,0
АСТН-(4-10)	12,4	20,5	Бомбезин	22,6	26,0
АСТН-(4-11)	33,1	30,0	Гастрин-1	26,8	28,5
Ангиотензин II	27,4	23,0	АСТН-(18-39)	20,2	30,5
Вещество Р-(4-11)	33,1	30,0	АСТН-(1-24)	34,9	21,5
Окситоцин	27,4	23,0	Мелиттин	61,3	46,0
(Arg) Вазопрессин	9,0	14,0	Глюкагон	39,7	36,0
(Lys) Вазопрессин	10,2	13,0	β -Эндорфин	41,5	34,0
(Arg) Вазотоцин	7,2	12,0			

^a Величины времени удерживания были рассчитаны следующим образом: коэффициенты удерживания, приведенные в табл. 5.2, суммировали для каждого пептида и прибавляли к полученному результату 2 мин.

листирол-дивинилбензольной матрице. Область применения ионообменных колонок на основе силикагеля ограничена вследствие химической нестабильности неподвижной фазы [16]. Более прочное связывание более крупных пептидов и полистирол-дивинилбензольной матрицы затрудняет их очистку этим методом [17]. С момента разработки двухколоночной системы [18] в области разделения аминокислот и пептидов были достигнуты значительные успехи. В частности, разработан одноколоночный метод разделения, получили распространение стабильные смолы с малым размером частиц и новые реакции синтеза производных аминокислот и пептидов для их обнаружения.

Разделение и обнаружение аминокислот и пептидных гормонов на пикомольном уровне можно осуществлять при помощи модифицированного коммерчески доступного хроматографа, оснащенного автоматической системой формирования градиента, колонкой с ионообменной смолой с малым размером частиц (от 5 до 8 мкм) и системой обнаружения на основе реакции с флуорескаминам [19].

На рис. 5.1 изображена функциональная диаграмма автоматического аминокислотного анализатора, работающего по методу ВЭЖХ с использованием флуорескамина в качестве реагента для обнаружения. Элюирование ведется в градиентном режиме с применением двух цитратных буферов (рН 2,6 и 6,3;

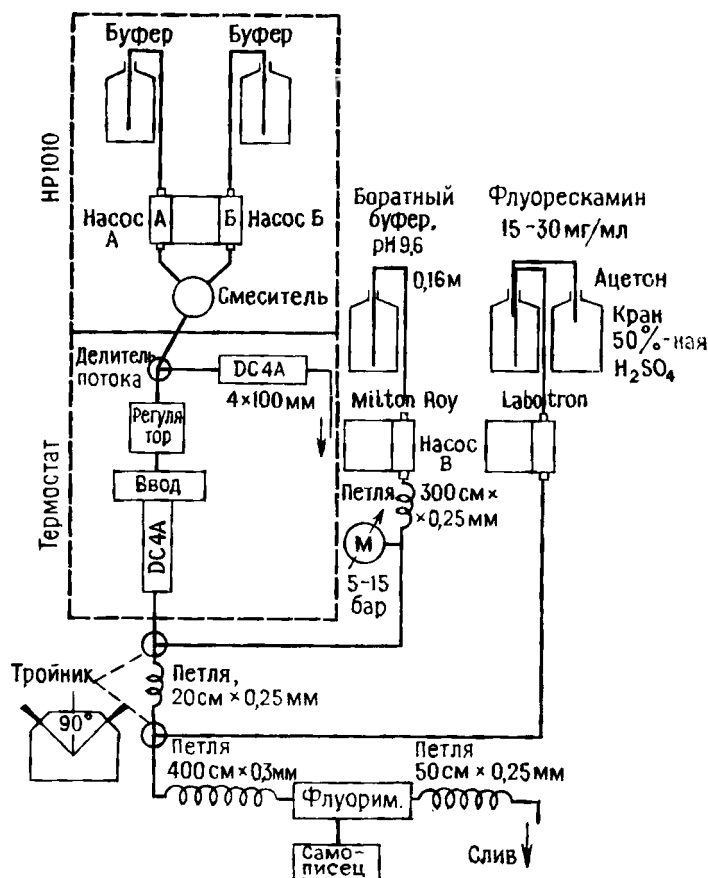


Рис. 5.1. Функциональная диаграмма автоматического ВЭЖХ-анализатора аминокислот, пептидов и пептидных гормонов (для обнаружения компонентов смеси используется реакция с флуорескамином) [19].

0,2 и 1,2 М по Na^+). Поступающий из колонки элюат смешивается с боратным буфером до достижения рН 9,0 (оптимальное значение рН), обеспечивающего максимальную флуоресценцию [19].

Фталевый альдегид в присутствии 2-меркаптоэтанола взаимодействует с первичными аминогруппами аминокислот, пептидов и пептидных гормонов с образованием флуоресцирующих производных. Однако для повышения чувствительности метода обнаружения необходима десятикратная по сравнению с первоначально предложенной Ротом [20, 21] концентрация 2-меркаптоэтанола [22]. По сравнению с флуорескамином фталевый

альдегид имеет два преимущества: он в пять — десять раз более чувствителен, чем флуорескамин, и растворим в водных системах [22—24].

5.2.3. Ион-парная высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод разделения аминокислот, пептидов и пептидных гормонов на обращенных фазах с применением «парных ионов» [25—28] имеет целый ряд названий, например: катионообменный метод с использованием детергентов [29], ион-парная хроматография [30, 31], мыльная хроматография [27], ионообменная хроматография, генерируемая растворителем [32], сольватобно-ионная хроматография [33], хроматография с использованием поверхностно-активных веществ [34]. Рядом авторов предложены различные механизмы удерживания соединений на колонках, в том числе сольватобный [25, 35, 36] и ионообменный [33, 37, 38]. Тем не менее динамическое равновесие, вероятнее всего, регулируется электростатическими, элюофильными, элюофобными, адсорбобильными и адсорбобными силами.

Алкилсульфонаты и фосфат додециламмония [39, 40], добавляемые в подвижную фазу в концентрации от 0,05 до 5 ммоль/л, — это традиционные для ион-парной хроматографии поверхностно-активные ионы [41—43]. По данным авторов работы [36], зависимость коэффициента емкости k для полярных молекул от концентрации парного иона описывается следующим уравнением:

$$k = (k_0 + \beta[X] (1 + k_2[X])^{-1} (1 + k_3[X])^{-1}) \quad (1)$$

где k_0 — коэффициент емкости в отсутствие противоиона X и β , k_2 и k_3 — соответствующие равновесные константы ассоциации.

Если ОФ-ВЭЖХ пептидных гормонов дает размытые пики, низкие выходы разделяемых соединений или плохое разрешение, ион-парная хроматография позволяет исправить положение, как это продемонстрировали авторы работы [44] на примере разделения тиреолиберина (фактор высвобождения либерина, или тиреолюберин), вещества Р, аргинин-вазопрессина и энкефалинов [44].

5.3. Разделение пептидных гормонов методом ВЭЖХ

5.3.1. Гормоны гипоталамуса

Гипоталамус представляет собой центр нейросекреторной деятельности нашего тела. В областях *nucleus supraopticus* и *nucleus paraventricularis* образуются окситоцин и вазопрессин, а биосинтез нейросекреторных регуляторных гормонов

Таблица 5.4. Названия, структура и регуляторный эффект рилизинг-факторов гипоталамуса [46, 47]

Название		Структура (предполагаемая)	Регуляторный эффект
традиционное	согласно номенклатуре ИЮПАК		
Кортикотропина рилизинг-фактор	Кортиколиберин	Ac-Ser-Tyr-Cys-Phe-His-(Asn, Gln)-Cys(Pro, Val)-Lys-Gly-NH ₂	Образование АСТН ^a
Фолликулостимулирующего гормона рилизинг-фактор	Фоллиберин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	Образование FSH
Лютеинизирующего гормона рилизинг-фактор	Люлиберин	Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH ₂	Образование LH
Меланоцитостимулирующего гормона рилизинг-фактор	Меланолиберин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn	Образование MSH
Пролактина рилизинг-фактор	Пролактолиберин		Образование PRL
Тиреотропина рилизинг-фактор	Тиреолиберин	Pyr-His-Pro-NH ₂	Образование TSH
Гормона роста рилизинг-фактор	Соматолиберин	H-Tyr-Ala-Asp-Ala-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Tyr-Arg-Lys-Val-Leu-Gly-Gln-Leu-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Ile-Met-Ser-Arg-Gln-Gln-Gly-Glu-Ser-Asn-Gln-Glu-Arg-Gly-Ala-Arg-Ala-Arg-Leu-NH ₂	Образование GH

гипоталамуса происходит в области *eminencia mediana* [45].

Список названий (с сокращениями), структур и регуляторных эффектов рилизинг-факторов гипоталамуса приведен в табл. 5.4, а в табл. 5.5 дан аналогичный список (включая названия, сокращения, структуры и регуляторный эффект) ингибирующих гормонов гипоталамуса.

Как следует из табл. 5.4 и 5.5, гипоталамус служит источником неизвестных пептидных гормонов [46, 47], которые до настоящего времени еще не выделены в чистом виде традиционными методами. При помощи классических хроматографических методов, не прибегая к ВЭЖХ, авторам работы [46] пришлось переработать 300 000 овечьих гипоталамусов, чтобы выделить 1 мг практически чистого тиреолиберина (ТЛ), необходимый для установления структуры [46].

Объединяя гель-фильтрацию и ОФ-ВЭЖХ, можно выделить чистые пептиды из нескольких сотен гипоталамусов по методи-

Таблица 5.5. Названия, структура и регуляторный эффект ингибирующих гормонов гипоталамуса [46, 47]

Название		Структура (предполагаемая)	Регуляторный эффект
традиционное	согласно номенклатуре ИЮПАК		
Гормон, ингибирующий высвобождение меланоцитстимулирующего гормона	Меланостатин	$\begin{array}{c} \text{Pro-Leu-Gly-NH}_2 \\ \text{Pro-His-Phe-Arg-Gly-NH}_2 \\ \text{Cys-Tyr-Ile-Gln-Asp-Cys-OH} \end{array}$	Подавляет рилизинг MSH ^a
Гормон, ингибирующий высвобождение пролактина	Пролактостатин		Подавляет рилизинг PRL ^a
Гормон, ингибирующий высвобождение гормона роста	Соматостатин	$\begin{array}{c} \text{Ala-Gly-Cys-Lys-Asp-Phe-Phe-Trp-} \\ \text{Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH} \end{array}$	Подавляет рилизинг GH ^a

^a Сокращения, используемые в табл. 5.4 и 5.5: ACTH — адренокортикотропный гормон, FSH — фолликулостимулирующий гормон, GH — гормон роста (соматотропин), LH — лютеинизирующий гормон, MSH — меланоцитстимулирующий гормон, PRL — пролактин, TSH — тиротропин (тиреоидстимулирующий гормон).

Таблица 5.6. Схема очистки овечьего TRH без использования методов ВЭЖХ, разработанная Бургусом и др. [46]

Номер стадии	Стадия	Число фрагментов гипоталамуса	Масса	TR, ед./мг
1	Лиофилизированный гипоталамус овец	294 000	25 кг	
2	Экстракция смесью спирт/хлороформ	294 000	294 г	1
3	Ультрафильтрация, мембрана UM-3	294 000	71 г	3
4 и 5	Двукратная гель-проиикающая хроматография: сефадекс G-25, 0,5 M уксусная кислота	286 000	16 г	16
6 и 7	Двукратная распределительная хроматография: 0,01%-ная уксусная кислота/н-бутанол/пиридин (11:5:3)	280 000	246 мг	800
8 и 9	Двукратная адсорбционная хроматография: норит, вода/этанол/фенол	275 000	4,2 мг	30 500
10	Распределительная хроматография: н-бутанол/уксусная кислота/вода (4:1:5) (верхняя фаза)	273 000	2,0 мг	58 500
11	Повтор стадия 10	270 000	1,0 мг	57 000

ке, значительно более простой, чем применявшаяся 10 лет назад [48]. Авторы работы [49] воспользовались сходной методикой для выделения соматолиберина (рилизин-фактора соматотропина) из опухоли поджелудочной железы человека [49]. Ткани опухоли экстрагировали 0,3 М соляной кислотой, пропускали экстракт через колонку с сефадексом G-75 и далее проводили разделение методом ВЭЖХ на двух последовательно соединенных колонках с обращенными фазами (вторая колонка: 250×4 мм внутр. диаметр, неподвижная фаза: ультрасфер C₁₈, 5 мкм) [49].

В настоящее время опубликован ряд подробных исследований по разделению гормонов гипоталамуса методом ВЭЖХ [50—63]. Информация об условиях разделения приведена в табл. 5.7.

Объединяя гель-фильтрацию на колонке с сефадексом G-25, противоточную экстракцию, хроматографию на КМ-целлюлозе, распределительную хроматографию на SE-сефадексе и ОФ-ВЭЖХ (μ-бондапак C₁₈, вода, ацетонитрил, 2-пропанол), группа ученых под руководством Шалли [57] выделила десять пептидов (Arg-Phe, Phe-Tyr, Val-Trp, Tyr-Phe, Lys-Phe-Tyr, Gly-Lys-Val-Asn, Phe-Glu-His-Glu, Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe, Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe, Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asn-Leu), некоторые из них проявили биологическую активность.

5.3.1.1. Тиреолиберин (ТРФ). Для ТРФ, самого маленького пептидного гормона, ОФ-ВЭЖХ представляет собой наиболее эффективный из числа известных в настоящее время метод анализа и разделения [15, 50, 52, 55, 56, 60—62, 64—66]. Это подтверждает, в частности, тот факт, что указанным способом можно определить 0,7% (D-His²)-изомера тиреолиберина в присутствии тиреолиберина (рис. 5.2) [50].

Несмотря на то что молекула тиреолиберина не содержит хорошо поглощающей хромофорной группы, ее разложение в водных растворах можно с успехом наблюдать по поглощению при 215 нм (рис. 5.3) [52].

Улучшить разрешение можно путем использования лигандо-обменной методики, основанной на комплексообразовании с ионами Cu²⁺, что демонстрируют, в частности, рис. 5.4 и 5.5, на которых показаны хроматограммы, полученные при разделении четырех изомеров пироглутамилгистидил-3,3-диметилпролинамидных производных ТРФ.

В принципе любую методику аналитического разделения посредством ВЭЖХ можно масштабировать в препаративную [67] или полупрепаративную [68]. Сравнение ряда параметров аналитических и препаративных колонок для ВЭЖХ приведено в табл. 5.8.

Таблица 5.7. Условия разделения гормонов гипоталамуса и их производных методом ВЭЖХ (структуры см. в табл. 5.4 и 5.5)

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Тиреолиберин					
μ -Боидапак C_{18} (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0) (0,5 : 99,5), (3 мл/мин)	4 $\times$ 300	УФ (210)	—	50
Неподвижная фаза для анализа жирных кислот фирмы Waters (10 мкм)	0,1%-ная уксусная кислота/метанол (2 : 3), 1,5 мл/мин	3,9 $\times$ 300	УФ (215)	—	52
μ -Боидапак C_{18} (10 мкм)	А: триэтиламинфосфорная кислота (рН 3,2), Б: триэтиламинфосфорная кислота (рН 3,2)/ацетонитрил 40 : 60, градиент от 2 до 70% Б за 78 мин (1,5 мл/мин)	4 $\times$ 300	УФ (210)	1,18 ($t_A = t_R - t_0$)	55
	Ацетонитрил/1-гексансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2,75 : 0,1 : 97,15 (2 мл/мин)	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62
	Ацетонитрил/1-гептасульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 6,5 : 0,1 : 93,4 (2 мл/мин)	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62
	Ацетонитрил/1-пентансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2 : 0,1 : 97,9 (2 мл/мин)	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62
Pyг-His-Pro-OH					
μ -Боидапак C_{18} (10 мкм)	Ацетонитрил/1-гексасульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2,75 : 0,1 : 97,15 (2 мл/мин)	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62
	Ацетонитрил/1-гептасульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 6,5 : 0,1 : 93,4 (2 мл/мин)	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62
	Ацетонитрил/1-пентаансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2 : 0,1 : 97,9	3,9 $\times$ 300	УФ (210)	—	62

Pyg-His-Pro-Gly-NH₂

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

Ацетонитрил/1-гексансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2,75 : 0,1 : 97,15 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62
Ацетонитрил/1-гептансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 6,5 : 0,1 : 93,4 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62
Ацетонитрил/1-пентансульфокислота/0,02 М уксусная кислота 2 : 0,1 : 97,9 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62

Pyg-3-метил-His-Pro-NH₂

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

Ацетонитрил/1-гексансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2,75 : 0,1 : 97,15 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62
Ацетонитрил/1-гептансульфокислота/0,02 моль/л уксусная кислота, 6,5 : 0,1 : 93,4 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62
Ацетонитрил/1-пентансульфокислота/0,02 М уксусная кислота, 2 : 0,1 : 97,9 (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (210)	—	62

L-Pyg-L-His-L-3,3-диметилпролинамид

Сферисорб-CN
(5 мкм)

Ацетонитрил/0,01 мМ ацетат меди (II), 30 : 70 (0,5 мл/мин)	4,6×250	УФ (210)	—	58
Ацетонитрил/0,01 мМ ацетат меди (II), 30 : 70 (0,5 мл/мин)	4,6×250	УФ (210)	—	58
Ацетонитрил/0,01 мМ ацетат меди (II), 30 : 70 (0,5 мл/мин)	4,6×250	УФ (210)	—	58
Ацетонитрил/0,01 мМ ацетат меди (II), 30 : 70 (0,5 мл/мин)	4,6×250	УФ (210)	—	58

(D-His²)-тиреолиберин

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 0,5 : 99,5 (3 мл/мин)	4×300	УФ (210)	—	50
---	-------	----------	---	----

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Люлиберин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	11,8 мин (время удерживания)	50
	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (2 мл/мин)	4×300	УФ (210)	6,2 мин (время удерживания)	50
	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 17 : 83 (2,5 мл/мин)	4×600	УФ 210		50
Фенил-корасил	Ацетонитрил/вода, 1 : 4 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	>20	51
	Ацетонитрил/вода, 2 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	>20	51
	Ацетонитрил/вода, 7 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	>20	51
Порагель PN (37—75 мкм)	Ацетонитрил/вода, 2 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	≈ 10	51
Порагель PS (37—75 мкм)	Ацетонитрил/вода, 7 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	>10	51
	Вода (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	>20	51
	Ацетонитрил/вода, 2 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	0,2	51
	Ацетонитрил/вода, 7 : 3 (1,0 мл/мин)	3'×1/8"	УФ 254, 220	2,1	51
Неподвижная фаза для анализа жир- ных кислот фирмы Waters (10 мкм)	8%-ная уксусная кислота/метанол, 2 : 3 (1,5 мл/мин)	3,9×300	УФ 254	—	52
	8%-ная уксусная кислота/метанол, 1 : 1 (1,5 мл/мин)	3,9×300	УФ 254		52
	8%-ная уксусная кислота/метанол, 3 : 2 (1,5 мл/мин)	3,9×300	УФ 254	—	52
Гель TSK-2000 (10 мкм)	0,05 М фосфат натрия/SDS 99,7 : 0,3 (0,3 мл/мин)	7,5×600	УФ 210, 280	14,9 (объем элюирования)	59
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	А: 0,1%-ная фосфорная кислота. Б: 70% ацетонитрил в А, линейный градиент от 5 до 70% Б (20 мин, 1 мл/мин)	3,9×300	УФ 206	—	61

(L-Ala⁶)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (2 мл/мин)	4×300	УФ 210	7,7 мин (время удерживания)	50
	Этанол/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (4 мл/мин)	4×300	УФ (210)	6,5 мин (время удерж.)	50

(D-Ala⁶)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (4 мл/мин)	4×300	УФ (210)	5,9 мин (время удерж.)	50
---	--	-------	----------	------------------------------	----

(D-Tyr⁶)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (2 мл/мин)	4×300	УФ (210)	13,0 мин (время удерж.)	50
---	---	-------	----------	-------------------------------	----

(D-His²)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 17 : 83 (2,5 мл/мин)	4×600	УФ (210)	—	50
---	---	-------	----------	---	----

(D-Lys⁶)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (2 мл/мин)	4×300	УФ (210)	3,5 мин (время удерж.)	50
---	---	-------	----------	------------------------------	----

(Sar¹⁰)-люлиберин

μ -Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0), 22 : 78 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	13,0 мин (время удерж.)	50
---	--	-------	----------	-------------------------------	----

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Des-Gly ⁶ -люлиберин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 22 : 78 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	12,7 мин (время удерж.)	50
Des-Ser ⁴ -люлиберин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 22 : 78 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	12,5 мин (время удерж.)	50
Меланостатин, дансильное производное					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 45 : 55 (3мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	24	54
μ-Бондапак феннл (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 45 : 55 (3мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	3,2	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 40 : 60 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	5,0	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	5,3	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	7,0	54

	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	8,0	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	4,5	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	3,2	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 20 : 80 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 80 : 20 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	0,4	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Метанол/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Изопропанол/1%-ная уксусная кислота, 5 : 95 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	0,6	54
Радиалпак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	8×200	Флуоресценция (350/470)	—	63

Меланостатин, этаксильное производное

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция	30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	7,6	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 40 : 60 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	21	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	12	54

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (яя)	k	Лите- ратура
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	11	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	16	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	13	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	6,6	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	6,8	54
	Метанол/сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54

Мелаиостатин, пропансильное производное

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 40 : 60 (3 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54

	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	14	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	7,8	54
	Метанол/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54

Меланостатин, бутаисильное производное

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 40 : 60 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (рН 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	29	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	12	54
	Метанол/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	30	54
Меланостатин, моноизопропансильное производное					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	6,2	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	3,2	54
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 40 : 60 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	11	54
	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	7,0	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 43,5 : 56,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	5,3	54

μ-Боидапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	8,2	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 41,5 : 58,5 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	8,0	54
μ-Боидапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	4,0	54
μ-Бондапак фенил (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	3,2	54
	Метанол/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 50 : : 50 (3 мл/мин)	3,9×300	УФ (254) Флуоресценция (360/487)	>30	54

L-Pro-N-метил-D-Leu-Gly-NH₂

Радиалпак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М сульфат натрия (pH 7,0), 45 : 55 (3 мл/мин)	8×200	Флуоресценция (350/470)		63
---------------------------------------	---	-------	----------------------------	--	----

Соматостатин

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35 : 65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	12,5 мин (время удерж.)	50
Неподвижная фаза для анализа жир- ных кислот фирмы Waters (10 мкм)	8%-ная уксусная кислота/метанол 1 : 1 (1,5 мл/мин)	3,9×300	УФ (254)	—	52
μ-Боидапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 32,5 : 67,5 (1,4 мл/мин)	—	УФ (210)	—	53
μ-Бондапак C ₁₈	А: триэтиламинфосфорная кислота (pH 3,2), Б: триэтиламинфосфорная кислота (pH 3,2)/ ацетонитрил, 40 : 60, градиент от 2 до 70% Б за 78 мин (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	51,72	55

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Лите- ратура
Гель TSK-2000 (10 мкм)	0,05 М фосфат натрия (pH 7,2)/SDS, 99,7:0,3 (0,3 мл/мин)	7,5×600	УФ (210, 280)	15,4 (объем элюирования)	59
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	А: 0,1%-ная фосфорная кислота, Б: 70% ацето- нитрила в А, линейный градиент от 5 до 70% Б (20 мин), 1 мл/мин)	3,9×300	УФ (206)	—	61
(Asp ⁵)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	24,2 мин (время удерж.)	50
(D-Cys ¹⁴)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	15,1 мин (вре- мя удерж.)	50
(D-Phe ¹¹)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	12,7 мин (вре- мя удерж.)	50
(D-Ser ¹³)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	15,2 мин (вре- мя удерж.)	50
(D-Thr ¹²)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0), 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	15,6 мин (вре- мя удерж.)	50
(D-Phe ⁶)-соматостатин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Этанол/0,01 М ацетат аммония (pH 4,0) 35:65 (1,5 мл/мин)	4×300	УФ (210)	19,4 мин (вре- мя удерж.)	50

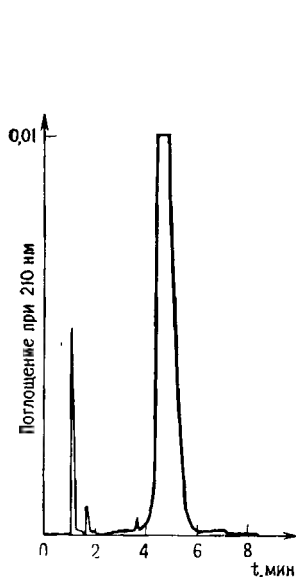


Рис. 5.2. Хроматограмма, полученная при разделении (D-His²)-ТРФ и ТРФ методом ВЭЖХ [50].

Колонка: 300×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: μ -бондапак C₁₈; элюент: 0,5% CH₃CN/0,01 M NH₄OAc (pH 4,0); объемная скорость: 3 мл/мин; обнаружение: при 210 нм; проба: 50 мкг ТРФ+0,36 мкг (0,7%) (D-His²)-ТРФ.

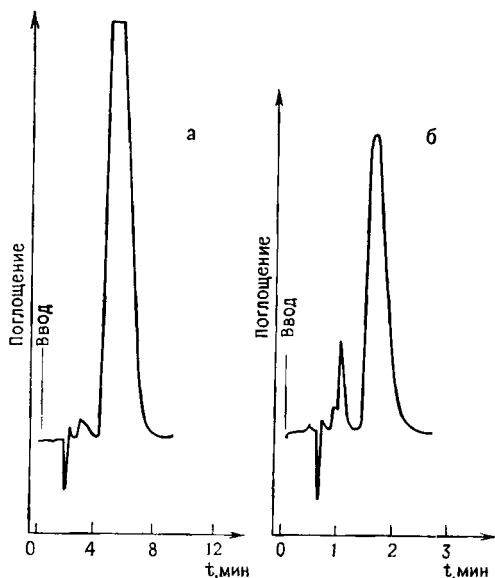


Рис. 5.3. Хроматограммы, полученные при разделении водных растворов ТРФ [52].

Колонка: 300×3,9 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: для анализа жирных кислот (10 мкм); элюент: 60%-ный метанол в 0,1%-ной уксусной кислоте; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: при 215 нм.

а — свежеприготовленный раствор, *б* — тот же раствор после хранения в течение 27 сут при 4 °С.

На рис. 5.6 изображена схематическая диаграмма preparative системы ВЭЖХ для preparative разделения синтетического тиреолиберина и его аналогов на сильнокислотном ионообменнике при элюировании летучим элюентом. В системе использован буфер на основе пиридина и уксусной кислоты, который поступает на стеклянную термостатированную высоко-

Таблица 5.8. Сравнение технических характеристик аналитических и preparative колонок для ВЭЖХ

Характеристики колонки	Аналитическая колонка	Preparative колонка
Длина колонки, см	От 20 до 25	50
Диаметр колонки (внутренний), мм	От 3,5 до 4,5	От 8 до 20
Количество носителя	От 2 до 3	От 20 до 150
Объемная скорость, мл/мин	От 1 до 2	От 5 до 20

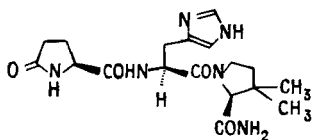


Рис. 5.4. Структура пироглутамил-L-гистидил-3,3-диметилпролинамнда.

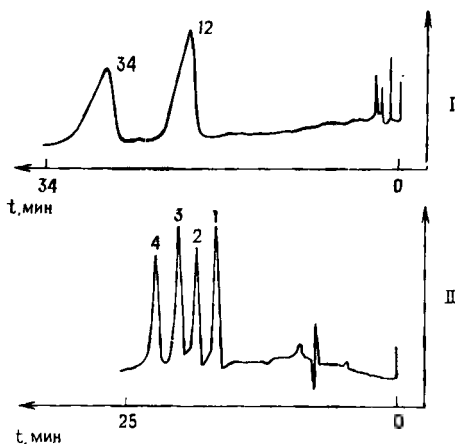


Рис. 5.5. Хроматограмма, полученная при разделении L-пироглутамил-L-гистидил-L-3,3-диметилпролинамнда и его изомеров [58].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: сферисорб CN (5 мкм); элюент: а — ацетонитрил/0,01 мМ ацетат натрия (30 : 70); объемная скорость: 2 мл/мин; б — ацетонитрил/0,01 мМ ацетат меди (30 : 70); объемная скорость: 0,5 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 210 нм. 1 — L-L-D; 2 — L-D-L; 3 — L-L-L; 4 — D-L-L-изомер.

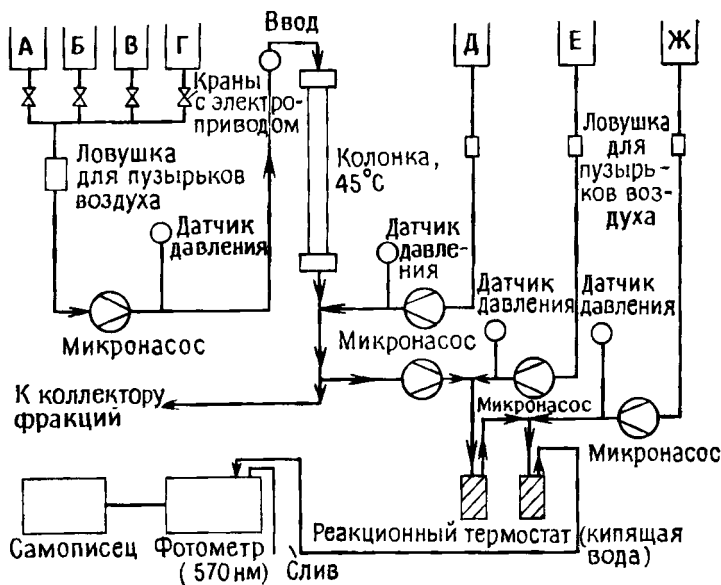


Рис. 5.6. Схема пептидного анализатора, оснащенного ионообменной колонкой [69].

А—Г — резервуары для буфера; Д — резервуар для воды; Е — резервуар для щелочи (5 М NaOH); Ж — резервуар для реагента нингидрин/уксусная кислота.

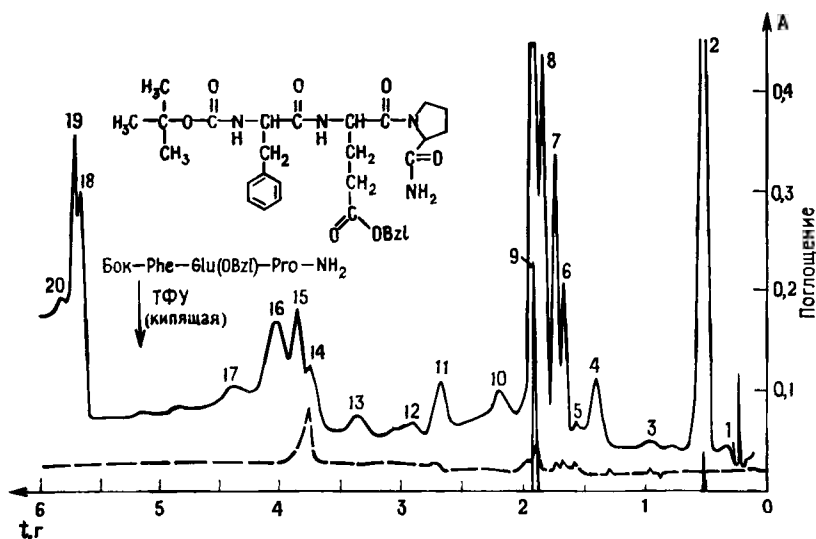


Рис. 5.7. Хроматограмма реакционной смеси, полученной в результате 2-часовой обработки Бок-Пептид-Глю(ОБзл)-Про-Н₂ кипящей ТФУ [69].

Колонка: 550×9 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: катионообменная смола DC-1A, 18±3 мкм (дуррум, Пало-Альто, шт. Калифорния, США); элюент (см. текст и подпись к рис. 5.6): буфер — пиридин/уксусная кислота, А — 0,2 М пиридин, рН 3,4 (60 мин), В — 0,5 М пиридин, рН 4,25 (120 мин), Г — 1,0 М пиридин, рН 5,0 (120 мин), Д — 4,0 М пиридин, рН 5,6 (180 мин); температура: 45 °С, давление: от 80 до 95 бар; объемная скорость: 1,5 мл/мин; деление потока элюата: 1 : 22=4,4% пробы расходуется на обнаружение; сплошная линия: обнаружение после частичного гидролиза, введено пробы 166 мг, собрано после разделения на фракции 155 мг; штриховая линия: обнаружение без частичного гидролиза, введено пробы 109 мг.
 2 — Пептид, Глю, Про (1,8 мг); 3 — Пептид, Глю, Про (2,3 мг); 4 — Пептид, Глю, Про (9,3 мг); 5 — Глю; 6 — Пептид, Глю (108 мг); 7 — Пептид, Глю, Про (17,4 мг); 8 — Пептид (30,5 мг); 9 — Пептид, Глю, Про (13,8 мг); 10 — Пептид, Глю, Про (16,4 мг); 11 — Пептид, Глю, Про (7,2 мг); 12 — Пептид, Про (2,7 мг); 13 — Пептид, Про (4,2 мг); 14 — Пептид, Про (11,1 мг); 15 — Пептид, Глю, Про (6,5 мг); 16 — Пептид, Глю, Про (17,9 мг); 17 — Пептид, Глю, Про (31 мг); 18 — Пептид (5,1 мг); 19, 20 — аминокислота отсутствует.

эффективную колонку (550×9 мм) фирмы Biotronic, заполненную катионообменной смолой DC-1A.

Небольшой объем элюата (5%) гидролизует 5 М раствором NaOH в тефлоновой петле (20 м×0,7 мм) при 100 °С. Аминокислоты в гидролизате обнаруживаются с использованием нингидринового реагента, 95% элюата поступает в коллектор фракций. Эта система ВЭЖХ позволила успешно осуществить очистку синтетических аналогов рилизинг-фактора тиреолиберина из мультикомпонентных смесей. На хроматограмме (рис. 5.7) видно больше число соединений, образующихся при реакции Глю²-трипептидов с кипящей трифторуксусной кислотой (ТФУ). Нет ничего удивительного в том, что при взаимодействии Бок-Пептид-Глю(ОБзл)-Про-Н₂ с кипящей ТФУ образуется реакционная смесь, из которой невозможно выделить ни один из чистых продуктов путем кристаллизации. Пептидный анали-

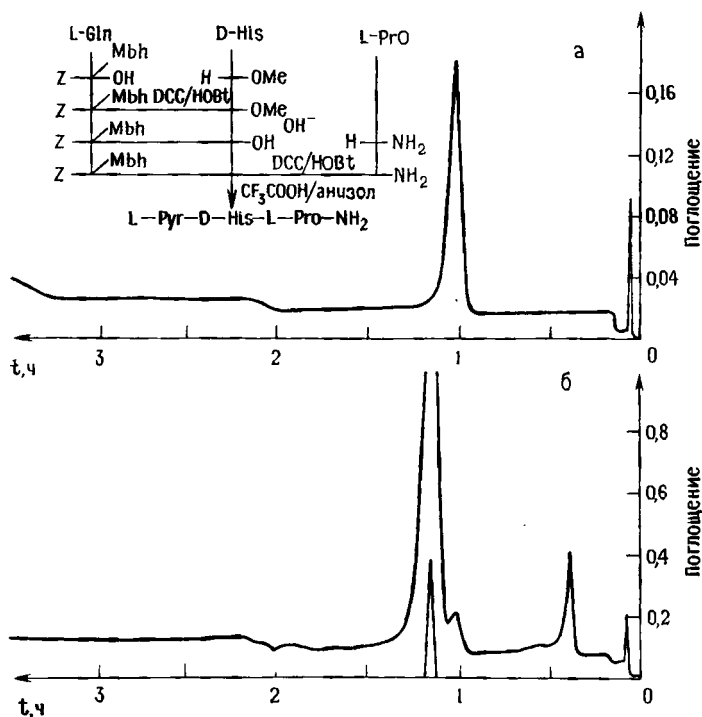


Рис. 5.8. Хроматограмма, полученная при препаративном разделении ТРФ и (D-His²)-ТРФ [69].

Колонка и неподвижная фаза: см. подпись к рис. 5.8; элюент (см. текст и подпись к рис. 5.6): А — 0,1 М ацетат пиридина, pH 3,2 (15 мин), Б — 0,2 М ацетат пиридина, pH 3,5 (45 мин), В — 0,3 М ацетат пиридина, pH 4,0 (60 мин), Г — 0,6 М ацетат пиридина, pH 4,2 (60 мин), Д — 1,0 М ацетат пиридина, pH 4,6 (80 мин); температура: 43 °С; давление: от 70 до 90 бар; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: с нитгидрином (570 нм) после частичного гидролиза (5%, с 5 М NaOH); проба: 8,7 (а) и 250 мг (б).

затор позволяет выделить и очистить из этой смеси 20 различных продуктов реакции, чистота которых достаточна для дальнейшей работы по установлению их структуры.

На рис. 5.8 сравниваются хроматограммы, полученные при препаративном разделении ТРФ и (D-His²)-ТРФ. Из хроматограммы (D-His²)ТРФ видно, что образец ТРФ содержит примерно 8% природного гормона. Согласно некоторым литературным данным [46], (D-His²)-ТРФ должен обладать значительной биологической активностью. В то же время хроматографически чистый (D-His²)-ТРФ совершенно неактивен. Это доказывает, что препаративный пептидный анализатор (рис. 5.6) пригоден также для препаративного разделения диастериомеров пептидов [69].

5.3.1.2. Люлиберин. Как и в случае с ТРФ, в последние годы появились многочисленные сообщения о разделении люлиберина методом ВЭЖХ [4, 15, 50—52, 56, 59—61, 64, 66, 70, 71]. Ввиду того что молекула люлиберина имеет две ароматические боковые цепи, это соединение можно обнаруживать количественно (при наномолярной концентрации) по поглощению при 254 им [52]. Метод ВЭЖХ достаточно чувствителен, в частности, он позволяет показать, что большинство поступающих в продажу пептидов, в том числе и люлиберин, не совсем чистые. При помощи метода ВЭЖХ можно обнаруживать даже очень малые количества примесей, примером тому служит хроматограмма, полученная при разделении 0,5 мкг люлиберина и 94 мкг (D-His²)-люлиберина (рис. 5.9) [50].

5.3.1.3. Соматостатин. Вследствие сравнительно малого молекулярного веса тетрадекапептид соматостатин также лучше всего очищать методами обращенно-фазовой хроматографии, как это показывают результаты многочисленных работ [4, 7, 14, 15, 43, 50, 52, 53, 55, 56, 59—61, 64, 72—74]. Насколько высока эффективность разделения обращенно-фазовой ВЭЖХ, показывает хроматограмма, полученная при разделении синтетической смеси десяти пептидов гипоталамуса, включая соматостатин. Эти десять синтетических олигопептидов, в цепи которых содержится от 3 до 31 аминокислотного остатка, можно разделить всего за 78 мин, причем чувствительность разделения составляет 5 мкг (рис. 5.10) [55].

Хромато-масс-спектрометрия с ионизацией электрическим полем позволяет определять в биологических тканях пикомольные количества эндогенных олигопептидов, типа соматостатина [60]. Авторы указанной работы использовали новую буферную систему разбавленный триэтиламин — муравьиная кислота, что позволило им определять соматостатин в фемтомольных концентрациях [60]. На рис. 5.11 приведена схема, иллюстрирующая эту «пикомольную» процедуру.

Метод ВЭЖХ все чаще и чаще используется в таких лабораториях, где занимаются синтезом пептидов с целью контроля чистоты промежуточных и конечных продуктов, а также кинетическими исследованиями, см., например, работы [75, 76]. Цистинсодержащий тетрадекапептид был получен путем конденсации 7+7 фрагментов (рис. 5.12). Защищенный по N-концу азид гептапептида был присоединен к гептапептиду, с C-конца которого была удалена 1-(1-адамантил)-1-метилэтоксикарбонильная защитная группа Адпок [75, 76].

Окисление этого защищенного тетрадекапептида иодом в смеси метанол/ДМФА (4:1) с последующей кратковременной обработкой соляной кислотой (0°C, 10 мин, раствор, насыщенный азотом) приводит к образованию грубого экстракта сома-

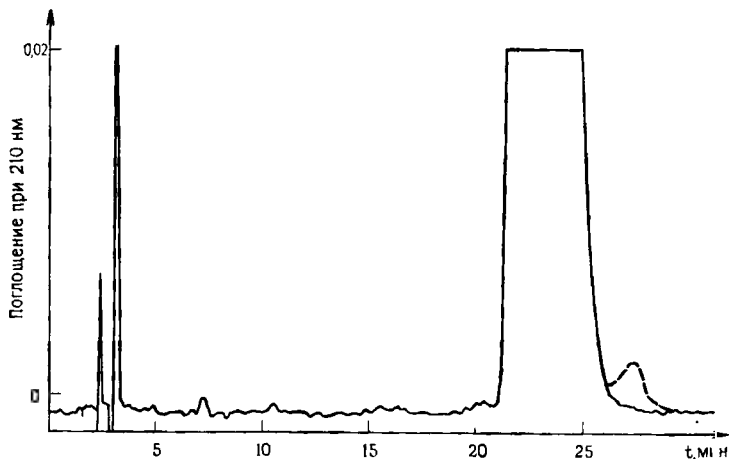


Рис. 5.9. Разделение (D-His²)-люлиберина и люлиберина методом ВЭЖХ [50]. Колонка: 600×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: μ -бондапак C₁₈, 10 мкм; элюент: 17% ацетонитрил/0,01 М ацетат аммония (рН 4,0); объемная скорость: 2,5 мл/мин; обнаружение: при 210 нм; количество: — 94 мкг (D-His²)-люлиберина, — — 94 мкг (D-His²)-люлиберина+1 мкг люлиберина.

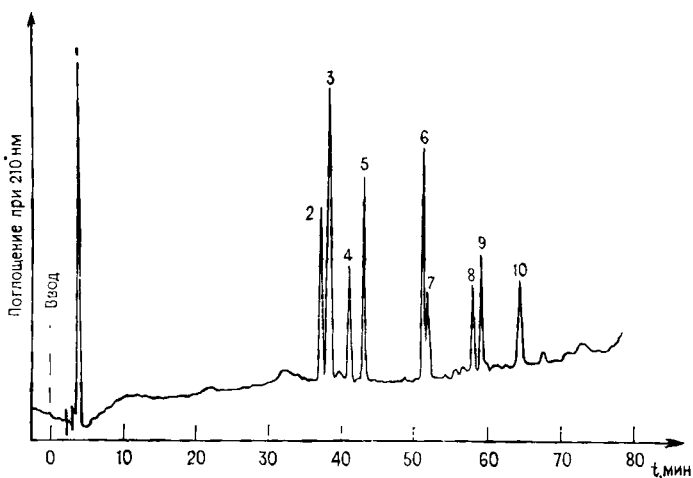


Рис. 5.10. Хроматограмма смеси синтетических олигопептидов гипоталамуса [55].

Колонка: 300×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: μ -бондапак C₁₈; элюент: А — триэтилaminофосфорная кислота, (рН 3,2), Б — триэтилaminофосфорная кислота/ацетонитрил (4:6), линейный градиент от 2 до 70% Б за 78 мин; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: при 210 нм; количество: по 2 мкг каждого пептида. 1 — ГРФ; 2 — мет-энкефалин; 3 — брадикинин; 4 — ангиотенсин I; 5 — элсозинсвязанный пептид, 6 — Tyr¹ SS, 7 — вещество Р, 8 — соматостатин, 9 — Tyr⁴ SS, 10 — β -эндорфин.

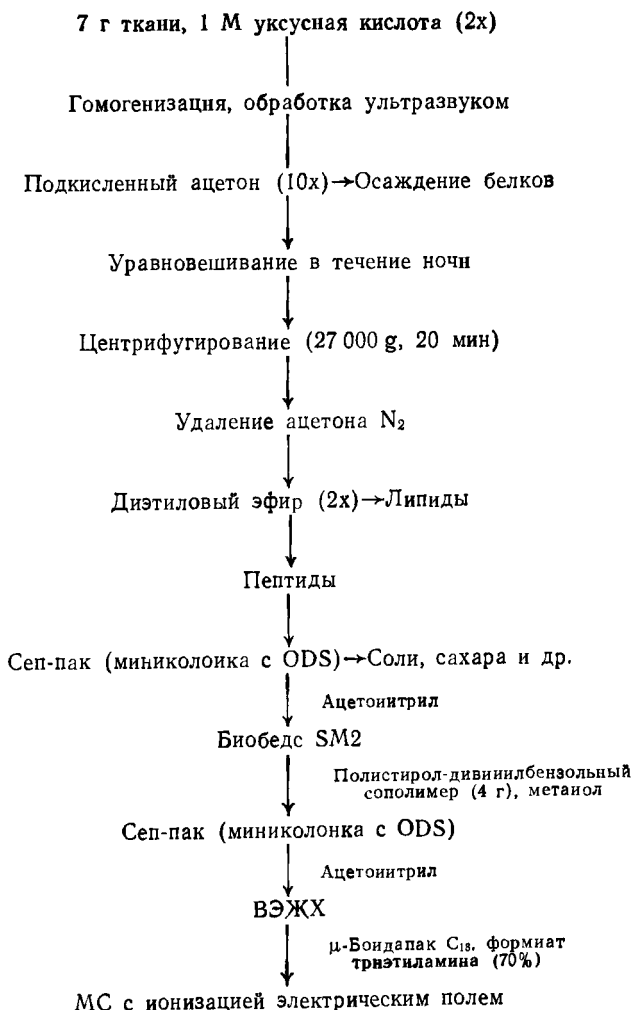
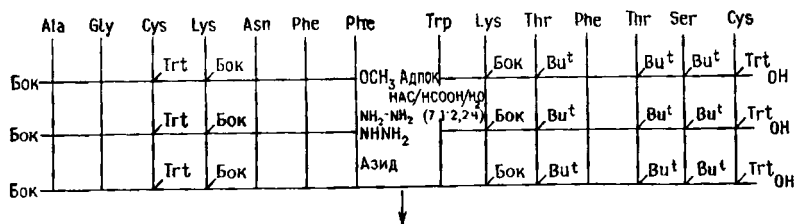


Рис. 5.11. Подготовка пробы для «пикомольной процедуры» [60].

тостатина. В результате разделения этого продукта на сефадексе G-25 при элюировании 2 М уксусной кислотой получают три фракции, которые исследуют методом ВЭЖХ (рис. 5.13). Основной пик фракции II совпадает с соответствующим пиком контрольного образца. Дальнейшая очистка этой фракции методом полупрепаративной ВЭЖХ дает очень чистый продукт, гомогенность которого подтверждают ВЭЖХ (рис. 5.14), ТСХ в семи различных системах растворителя, электрофорез и аминокислотный анализ.



1. I₂/метанол-ДМФ(4:1)
2. HCl (32%-ная, 0°C, N₂, 8 мин)

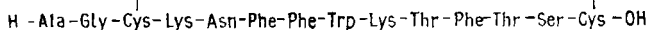


Рис. 5.12. Синтез соматостатина путем конденсации 7+7 фрагментов [75, 76].

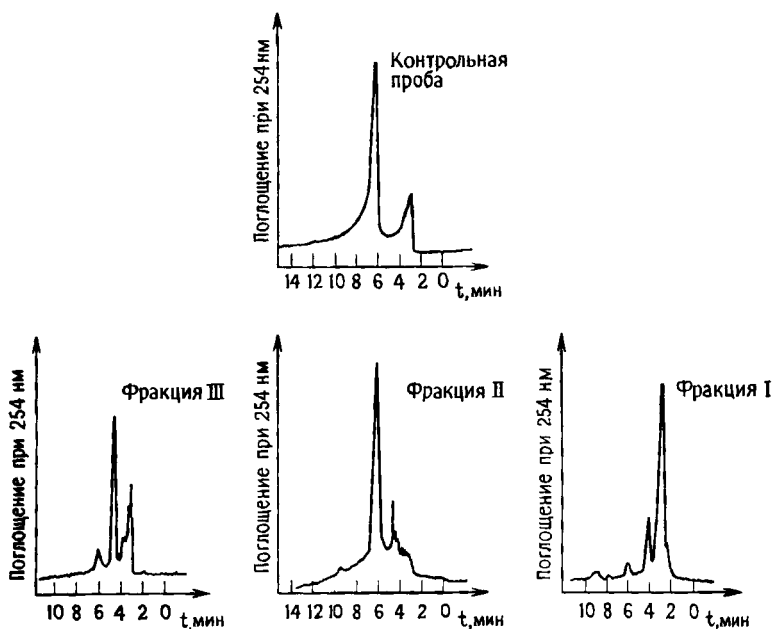


Рис. 5.13. Хроматограммы грубого экстракта синтетического соматостатина после его предварительной очистки [73, 76].

Предварительная очистка. Колонка: 800×6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: сефадекс G-25; элюент: 2 М уксусная кислота.

Разделение. Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: RP-8, 10 мкм; элюент: изопропанол/0,01 М ацетат аммония, pH 4,4 (35:65); объемная скорость: 1,5 мл/мин; давление: 210 бар; температура: 25°C; обнаружение: по поглощению при 254 нм.

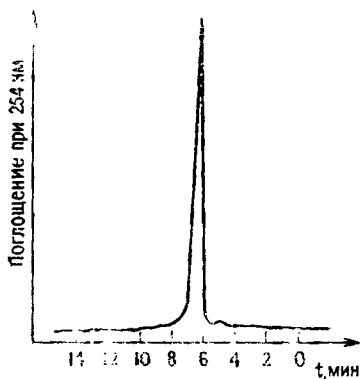


Рис. 5.14. Хроматограмма чистого соматостатина (условия разделения см. в подписи к рис. 5.13) [75, 76].

Этот успешный синтез соматостатина стал возможен только благодаря разработке нового способа защиты аминокрупп при помощи группы Адпок, которую можно удалить в очень мягких кислотных условиях, тогда как реагенты, предназначенные для удаления обычно применяемой группы Бок (трет-бутилокси-карбонил) с Бок-Тгр-пептидов, вызывают алкилирование индольного кольца триптофана, что дает биологически неактивные пептиды [68].

Именно ВЭЖХ позволила выявить преимущества защиты при помощи группы Адпок по сравнению с другими методами защиты аминокрупп. Перечислим некоторые из них.

Остатки Адпок присоединяются к аминокруппам с высоким выходом; модифицированные Адпок аминокислоты представляют собой кристаллические соединения, сохраняющие устойчивость в течение месяцев при комнатной температуре; модифицированные Адпок аминокислоты устойчивы к действию света; группы Адпок удаляются в очень мягких условиях; группы Адпок можно удалить в 1000 раз быстрее, чем группы Бок, что позволяет проводить селективное отщепление; группы Адпок предотвращают атаку на индольное кольцо триптофана.

Данные, полученные при исследовании кислотного отщепления групп Адпок методом ВЭЖХ и масс-спектрометрии, положены в основу предполагаемого механизма этой реакции (рис. 5.15).

Группы Бок в N^ε-положении имеют в два с лишним раза большую стабильность, чем в N^α-положении. Используя для снятия защиты смесь уксусная кислота/муравьиная кислота (83%)/вода (7:1:2), можно проводить избирательное отщепление групп Адпок в присутствии групп N^ε-Бок (рис. 5.18).

В табл. 5.9 приведены время полупревращения, время 99,9%-ного отщепления и константы скорости k' , в различных кислотных растворителях, определенные методом ВЭЖХ.

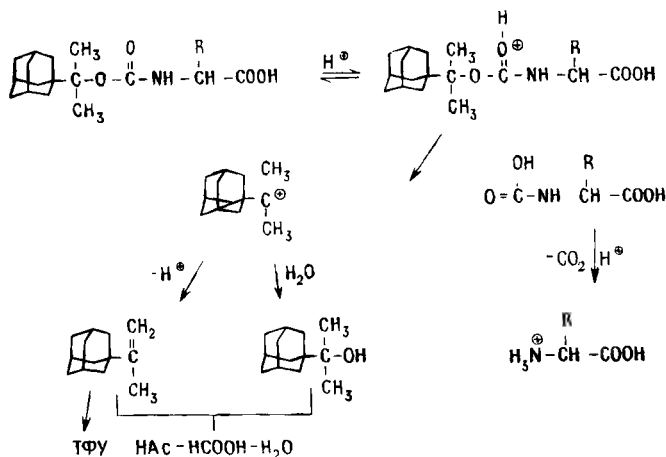


Рис. 5.15. Механизм кислотного отщепления группы Адпок [75, 76].

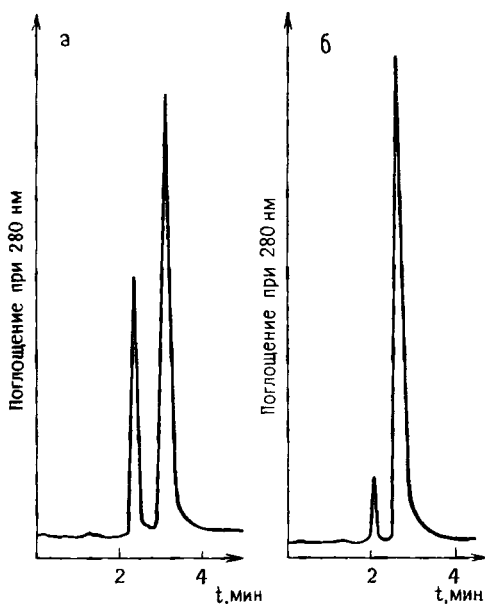


Рис. 5.16. Разделение продуктов кислотного отщепления Адпок-Тгр-ОН методом ВЭЖХ [75, 76].

Обработка пробы проводилась смесью 3%-ная трифторуксусная кислота/метилхлорид при 25 °С, в течение 20 (а) и 40 с (б). Колонка: 250×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: RP-8, 10 мкм; элюент: метанол (90%)/вода (значение pH 5,2 установлено серной кислотой); объемная скорость: 2,5 мл/мин; давление на входе в колонку: 120 атм; обнаружение: по поглощению при 280 нм.

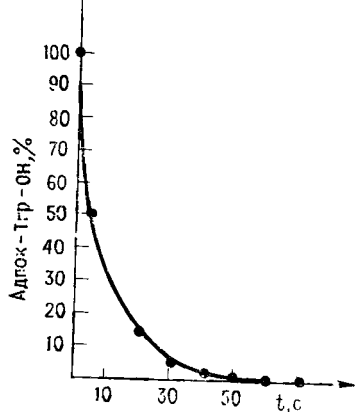


Рис. 5.17. Отщепление группы Адпок от Адпок-Трп-ОН в присутствии смеси 3%-ная трифторуксусная кислота/метиленхлорид при 25°C (условия эксперимента см. в подписи к рис. 5.16) [75, 76].

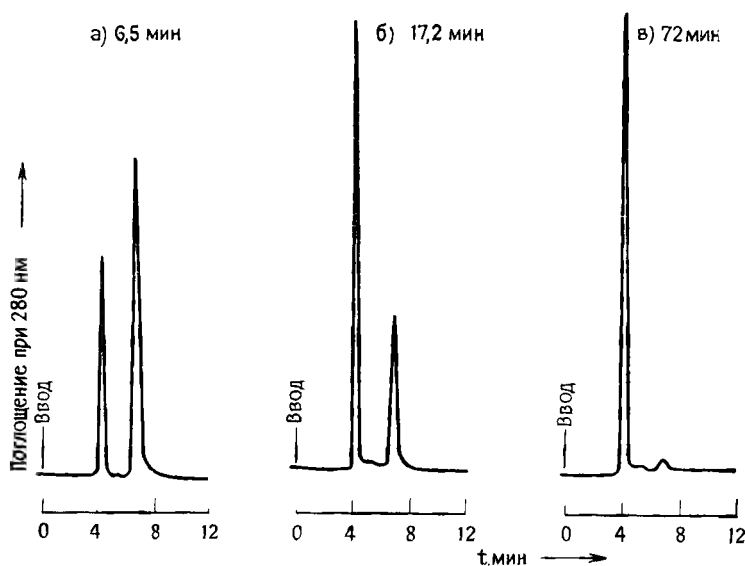


Рис. 5.18. Хроматограммы продуктов, образующихся в результате обработки Адпок-Трп-Lys-(Бок)-ОН смесью уксусная кислота/муравьиная кислота (83%)/вода (7 : 1 : 2) при 40°C, полученные методом ВЭЖХ (условия разделения см. в подписи к рис. 5.16) [75, 76].

Выход свободного Н-Трп-Lys(Бок)-ОН, %: а — 36,48, б — 65,99, в — 98,63. Отщепления группы N^ε-Бок не наблюдалось.

Таблица 5.9. Скорость снятия защиты Адпок-Тгр-ОН с использованием различных кислот (определено методом ВЭЖХ, условия эксперимента см. в подписи к рис. 5.16) [75, 76]

№	Кислотосодержащий растворитель	Снятие защиты, мин		k_t' , мин ⁻¹	k_t' отн (Бок=1)
		50 %	99,9%		
1	3% ТФУ/CH ₂ Cl ₂ , 25 °С	0,18	1,78	3,87	
2	3% ТФУ/CH ₂ Cl ₂ , 0 °С	1,1	11,7	0,63	
3а	Уксусная кислота/83%-ная (по массе) муравьиная кислота/вода (7:1:2 по объему), 40 °С	10,8	107	6,4 · 10 ⁻²	
3б	То же, что 3а, но 25 °С	35,5	354	1,95 · 10 ⁻²	590
4	Уксусная кислота 80% по объему, 40 °С	34	338	2,00 · 10 ⁻²	
Для сравнения снятие защиты в растворе 3б					
Блок-Pro-ОН, 25 °С		10,5		6,5 · 10 ⁻²	0,30 1470
N ^ε -Бок-Lys-ОН, 25 °С		36 сут.		1,3 · 10 ⁻⁵	
Бок-Gly-OEt, 25 °С		14 сут.		1,3 · 10 ⁻⁵	

Для констант скорости отщепления защитных групп в системе уксусная кислота/муравьиная кислота/вода (7:1:2) найдены следующие соотношения:

N^α-Бок : Адпок : Блок = от 1 : 600 до 1000 : 1800 и до 2700,

N^ε-Бок : Адпок : Блок = от 1 : 1500 : 4900 до 6800.

5.3.1.4. Меланостатин. Гормон, ингибирующий выделение меланотропина, мелантропин-ингибирующий гормон (МИГ, меланостатин) в последнее время привлекает все большее внимание в связи с попытками применить его для лечения болезни Паркинсона [77, 78]. Для контроля за разложением МИГ в организме необходимы методы, обеспечивающие эффективное

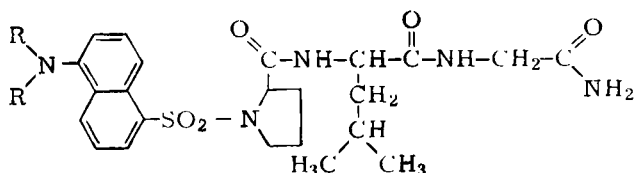


Рис. 5.19. Структура N-алкиламинонафтленсульфонильных производных МИГ. Дансил: R и R' = CH₃; этансил: R и R' = -CH₂-CH₃; пропансил: R и R' = -CH₂-CH₂-CH₃; R и R' = n-бутил; моноизопропансил: R = изопропил, R = H.

Таблица 5.10. Минимальные обнаруживаемые количества алкиламинонафтиленсульфонильных производных МИГ [54]

Алкиламинонафтиленсульфонильные производные МИГ	Минимальные обнаруживаемые количества, 10^{-12} моль
Дансильные	219
Этансильные	1014
Пропансильные	1217
Бутансильные	3388
Мононзопропансильные	320

разделение и чувствительное обнаружение. Поскольку в молекуле МИГ отсутствуют сильнопоглощающие аминокислотные остатки, а концевой Rго не взаимодействует с флуорескаминном или фталевым альдегидом, обнаружение МИГ осуществляют в виде его N,N-диалкиламинонафтиленсульфонильных производных [54]. Структура изученного N-алкиламинонафтиленсульфонильного производного МИГ показана на рис. 5.19.

Алкиламинонафтиленсульфонильные производные МИГ характеризуются интенсивной флуоресценцией, что позволяет обнаруживать их при содержании до 10^{-11} — 10^{-9} моль (табл. 5.10) [54]. Условия разделения этих соединений приведены в табл. 5.7.

Аналогичный метод пригоден также для определения пептида (L-пролил-N-метил-D-лейцил-глицинамида) — аналога МИГ, который имитирует физиологическую роль последнего [63].

5.3.2. Нейрогипофизарные пептидные гормоны

Известны семь нейрогипофизарных пептидных гормонов, которые образуются в *nucleus supraopticus* и *nucleus paraventricularis* гипоталамуса (табл. 5.11), и, пожалуй, ни одной группе гормонов не посвящено столько фундаментальных исследований по разделению методом ВЭЖХ [2, 3, 11, 14, 15, 17, 43, 56, 59, 62, 72, 79, 80—86]. Условия разделения этих гормонов методом ВЭЖХ и их структура указаны в табл. 5.12.

Как следует из табл. 5.13 и рис. 5.20, значения k зависят от величины pH и ионной силы элюента. Варьируя эти два параметра, можно подобрать такие условия, при которых нейрогипофизарные гормоны разделяются с хорошим разрешением [3].

Элюирующая сила растворителя определяется тремя типами межмолекулярных взаимодействий: дисперсионными, ориентационными и водородными связями [87]. Поэтому относительное

Таблица 5.11. Структуры природных нейрогипофизарных пептидных гормонов

Структура	Название
$\text{H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Аргинин-вазотоцин
$\text{H-Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Gln-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Глумитоцин
$\text{H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Лизин-вазопрессин
$\text{H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Аргинин-вазопрессин
$\text{H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Мезотоцин
$\text{H-Cys-Tyr-Ile-Ser-Asn-Cys-Pro-Ile-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Изотоцин (Ихтиотоцин)
$\text{H-Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2$ 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Окситоцин

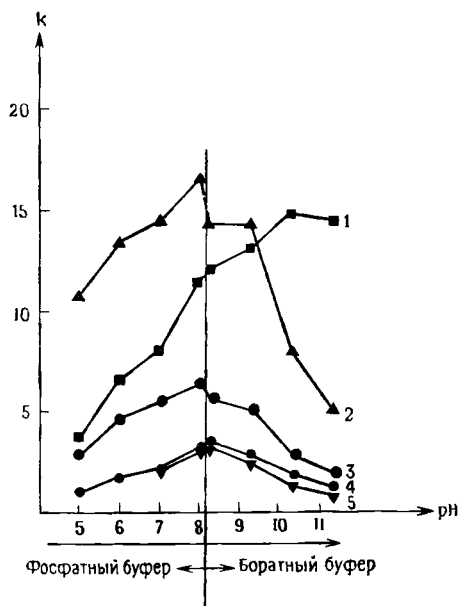


Рис. 5.20. Влияние величины pH на значения k окситоцина и производных вазопрессина при разделении методом ВЭЖХ [3].

Неподвижная фаза: нуклеосил C_{18} , 10 мкм; элюент: 20% ацетонитрила в 0,02 М фосфатном буфере (Серенсен), pH от 5,0 до 8,0; 20% ацетонитрила в 0,02 М боратном буфере (Серенсен) pH от 8,0 до 11,0; в обе подвижные фазы добавлен хлорид натрия до концентрации 0,05 М.
 1 — фелипрессин; 2 — демокситоцин;
 3 — окситоцин; 4 — лизин-вазопрессин;
 5 — орнипрессин.

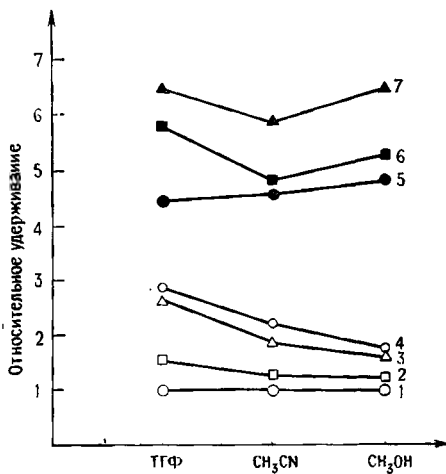


Рис. 5.21. Зависимость относительного удерживания α от природы органических модификаторов различных систем растворителей [85].

Колонка: 300×3,9 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: μ -бондапак C₁₈; элюент: А — 0,05 М ацетат аммония (pH 4,0), Б — 14% тетрагидрофурана или 22% ацетонитрила, или смесь 36% метанола плюс растворитель А до 100%; обнаружение: по поглощению в УФ-области.
1 — аргинин-вазотонин; 2 — глутонин; 3 — лизин-вазопрессин; 4 — аргинин-вазопрессин; 5 — мезотонин; 6 — изотонин;

удерживание структурно близких нейрогипофизарных пептидных гормонов сильно зависит от органического растворителя, содержащегося в подвижной фазе (рис. 5.21) [85].

Обнаружение, например, окситоцина по поглощению в УФ-области позволяет определять гормон в растворах, содержащих 1 международную единицу активности в 1 мл (табл. 5.14). В то же время ввод больших объемов может привести к уширению зон [80].

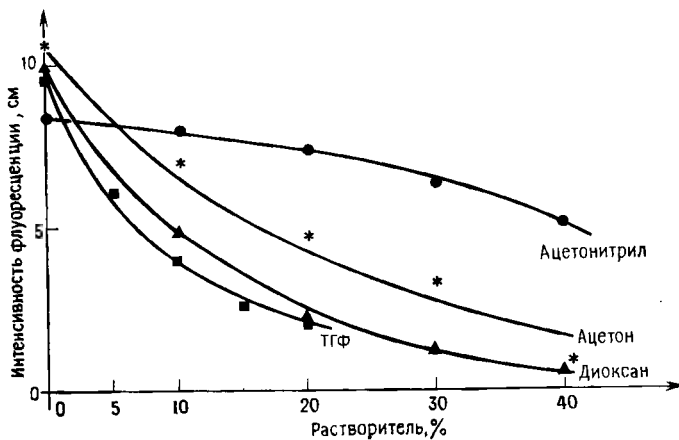


Рис. 5.22. Влияние различных растворителей на реакцию флуорескамина с окситоцином [2].

Холостой опыт: 5 мл буфера (pH 9,0, титризол, Мерк)+4 мл воды+5 мкл раствора окситоцина (200 межд. ед./мл)+1 мл флуорескамина (30 мг/100 мл ацетонитрила). На графике указаны истинные значения за вычетом результатов холодного опыта.

Таблица 5.12а. Условия разделения методом ВЭЖХ нейтрогипофизарных пептидных гормонов и их производных

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Окситоцин					
Si 60 (5 мкм)	Тетрагидрофуран/0,05 М уксусная кислота (2 : 1)	3×250	Флуоресценция (флуорескамин)	0,4	2
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (215)	3,9	3
	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (33 : 7)	3×250	УФ (215)	9,0	3
	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×150	УФ (215)	7,0	3
	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (3 : 1)	3×150	УФ (215)	2,2	3
	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×150	УФ (215)	7,3	3
Nucleosil C ₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×150	УФ (215)	7,3	3
	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×150	УФ (215)	7,3	3
ODS (Биорад)	А: 5 мМ фосфатный буфер+0,1 М NaClO ₄ (pH 7,4), Б: 0,1 М NaClO ₄ /ацетонитрил (40 : 60), градиент от А до Б за 80 мин (0,75% ацетонитрила/мин)		УФ (200, 220), флуоресценция (флуорескамин)	36,4 (время удерж.)	15
	А: 0,1%-ная фосфорная кислота +0,1 М NaClO ₄ (pH 2,1); Б: та же кислота+0,1 М NaClO ₄ /ацетонитрил (40 : 60), градиент от А до Б за 80 мин (0,75% ацетонитрила/мин)		УФ (200, 220) флуоресценция (флуорескамин)	37,9 (время удерж.)	15
Лихросорб RP-8	А: 0,1%-ная фосфорная кислота +0,1 М NaClO ₄ (pH 2,1), Б: 0,1%-ная фосфорная кислота+0,1 М NaClO ₄ /ацетонитрил (40 : 60), градиент от А до Б за 80 мин (0,75% ацетонитрила/мин)		УФ (200, 220) флуоресценция (флуорескамин)	—	15
Гель TSK-2000 SW (10 мкм)	0,005 М фосфата натрия (pH 7,2)/SDS (99,7 : 0,3) (0,3 мл/мин)	7,5×600	УФ (210, 280)	15,0 мл (объем элюирования)	59
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,02 М уксусная кислота+0,1%-ная 1-гексансульфокислота (20 : 80) (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (206)	10,1 мин (время элюирования)	62
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (pH 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3 < 250	УФ (210, 215, 220)	3,6 (ввод 34 мкл водного раствора)	80

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	0,1 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18) (2,0 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	27 мин (время удерж.)	82
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
Лихросорб RP-2	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/тетрагидрофуран (88 : 12)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (210, 215, 220)	3,9 (ввод 340 мкл водного раствора)	80
Нуклеосил C ₁₈ (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (4,0 мл/мин)	4×250	УФ (210)	—	80
Нуклеосил C ₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (1,8 мл/мин)	4×150	УФ (220)	—	80
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (3 мл/мин)	3×250	УФ (215)	—	80
Нуклеосил 10 C ₁₈	Ацетонитрил (16,7%)+метанол/0,1 М сульфат натрия+0,01 М фосфатный буфер (рН 2,2) (4 : 6) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	1,31	86
Партисил SCX	Ацетат пиридина, градиент 5·10 ⁻³ М пиридина (рН 3,0) до 5·10 ⁻² М пиридина (рН 4,0) за 50 мин 5·10 ⁻¹ М пиридина (рН 5,0) за 60 мин (16 мл/ч)	4,6×250	Флуоресценция (флуорескамин)	—	17
Si 60 (5 мкм)	Тетрагидрофуран/0,05 М уксусная кислота (2 : 1) (0,7 мл/мин)	3×250	Флуоресценция (флуорескамин)	0,4	2

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Демокситоцин					
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил, 4 : 1 (3 мл/мин)	3×250	УФ (215)	10,8	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (33 : 7) (3 мл/мин)	3×250	УФ (215)	29,0	3
Нуклеосил C ₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	17,5	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (3 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	4,3	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	21,1	3
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (210, 215, 220)	9,9 (ввод 34 мкл водно- го раствора)	80
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (210, 215, 220)	10,8 (ввод 340 мкл вод- ного раствора)	80
(1-Hemi-D-(α - ² H)-Cys)-окситоцин					
μ -Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	35 мин (время удерж.)	82
(2-D-Тур)-окситоцин					
μ -Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	38 мин (время удерж.)	82
(6-Hemi-D-(α - ² H)-Cys)-окситоцин					
μ -Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	52 мин (время удерж.)	82

8-D-(2-¹³C)-окситоцин

μ-Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	43 мин (время удерж.)	82
----------------------------	---	---------	----------	--------------------------	----

(3-L-(2-¹³C)-Leu)-окситоцин

μ-Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	17 мин (время удерж.)	82
----------------------------	---	---------	----------	--------------------------	----

(3-D-(2-¹³C)-Leu)-окситоцин

μ-Бондапак C ₁₈	0,1 М ацетат аммония (рН 4,0)/ацетонитрил (82 : 18) (2 мл/мин)	3,9×600	УФ (254)	22 мин (время удерж.)	82
----------------------------	---	---------	----------	--------------------------	----

Аргинин вазопрессин

Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : : 39) (2 мл/мин)	5×250	УФ (220)	—	11
Партисил SCX	Ацетат пиридина, градиент от 5·10 ⁻³ М пириди- на (рН 3,0) до 5·10 ⁻² М пиридина (рН 4,0) за 50 мин и до 5·10 ⁻¹ М пиридина (рН 5,0) за 60 мин (16 мл/ч)	4,6×250	Флуоресценция (флуорескамии)	—	17
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,02 М уксусная кислота+0,1%-ная 1-гексансульфоновая кислота (20 : 80) (2 мл/мин)	3,9×300	УФ (206, 210)	8,1 мин (время элюирования)	62
μ-Бондапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
Лнхросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
(D-Arg⁸)-вазопрессин					
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония, (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5×250	УФ (220)	—	11
Лизин вазопрессин					
Si 60 (5 мкм)	Тетрагидрофуран/0,05 М уксусная кислота (2 : 1) (0,7 мл/мин)	3×250	Флуоресценция (флуорескамин)	4,0	2
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил, (4 : 1) (3 мл/мин)	3×250	УФ (215)	1,4	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (33 : 7) (3 мл/мин)	3×250	УФ (215)	2,8	3
Нуклеосил C ₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	2,7	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (3 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	1,1	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3×150	УФ (215)	2,3	3
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (210, 215, 220)	1,3 (ввод 34 мкл водного раствора)	80
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3×250	УФ (210, 215, 220)	1,4 (ввод 340 мкл водного раствора)	80
μ-Болидапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85

	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1 × 250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1 × 250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (88 : 12)	2,1 × 250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1 × 250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1 × 250	УФ	—	85
	(L-Har ⁸)-вазопрессин				
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	(D-H ⁸)-вазопрессин				
	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	(Mpa ¹ ,L-Arg ⁸)-вазопрессин				
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	(Mpa ¹ ,L-Har ⁸)-вазопрессин				
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	(Mpa ¹ ,D-Arg ⁸)-вазопрессин				
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол, (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	(Mpa ¹ ,D-Har ⁸)-вазопрессин				
Нуклеосил 10 C ₁₈ (10 мкм)	0,05 М ацетат аммония (рН 6,5)/метанол (61 : 39) (2 мл/мин)	5 × 250	УФ (220)	—	11
	Аргинин-вазотоцин				
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Ацетонитрил/0,02 М уксусная кислота + 0,1%-ная 1-гексансульфоновая кислота (20 : 80) (2 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (210)	5,5 мин (время элюирования)	62

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Лите- ратура
μ-Бондапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
Лихросорб RP-2	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (88 : 12)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
Мезотоцин					
μ-Бондапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×390	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
Лихросорб RP-2	0,05 М ацетат аммония (рН 4,0)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (88 : 12)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85

	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
--	--	---------	----	---	----

Глюмитоцин

μ-Бондапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
Лихросорб RP-2	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (88 : 12)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85

Изотоцин

μ-Бондапак C ₁₈	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (86 : 14)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (78 : 22)	3,9×300	УФ	—	85
Лихросорб RP-8	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (64 : 36)	3,9×300	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (91 : 9)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
Лихросорб RP-2	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/тетрагидрофуран (88 : 12)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/ацетонитрил (82 : 18)	2,1×250	УФ	—	85
	0,05 М ацетат аммония (рН 4)/метанол (68 : 32)	2,1×250	УФ	—	85

Несободная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
Орнипрессин					
Si 50 (5 мкм)	Тетрагидрофуран/0,05 М уксусная кислота (2 : 1) (0,7 мл/мин)	3 × 250	Флуоресценция (флуорескамин)	—	2
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (80 : 20)	3 × 250	Флуоресценция (флуорескамин)	—	2
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (3 мл/мин)	3 × 250	УФ (215)	1,4	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (33 : 7) (3 мл/мин)	3 × 250	УФ (215)	2,8	3
Нуклеосил C ₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (3 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	2,7	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (3 : 1) (2 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	1,1	
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	2,3	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3 × 250	УФ (210, 215, 220)	1,3 (ввод 34 мкл водного раствора)	80
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3 × 250	УФ (210, 215, 220)	1,4 (ввод 340 мкл водного раствора)	80
Фелипрессин					
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (3 мл/мин)	3 × 250	УФ (215)	5,6	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (33 : 7) (3 мл/мин)	3 × 250	УФ (215)	11,7	3
Нуклеосил C ₁₈ (5 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	9,5	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (3 : 1) (2 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	2,8	3
	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1) (2 мл/мин)	3 × 150	УФ (210)	10,0	3
RP-8 (10 мкм)	Фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (4 : 1)	3 × 250	УФ (210, 215, 220)	5,6 (ввод 340 мкл водного раствора)	80

Таблица 5.126. Структуры производных вазопрессина и окситоцина

Структура	Название
$\text{H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly-NH}_2$	Орнипрессин
$\text{H-Cys-Phe-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH}_2$	Фелипрессин
$\text{H-Mpa-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH}_2$	Демокситоцин

Таблица 5.13. Влияние концентраций соли на значение k [3]

А. Неподвижная фаза: нуклеосил C_{18} (10 мкм); элюент: фосфатный буфер (рН 7)/ацетонитрил (от x : 80 до x : 20, где $x=10, 40, 60$ или 80 мл)

Концентрация фосфата в элюенте, 10^{-2} моль/л	Орнипрессин	Лизин-вазопрессин	Окситоцин	Фелипрессин	Демокситоцин
0,67	6,3	6,3	10,1	28,5	29,0
2,67	3,0	3,0	8,0	13,0	23,8
4,00	2,4	2,4	7,1	10,4	20,5
5,33	2,3	2,3	7,3	10,0	21,1

Б. Неподвижная фаза: нуклеосил C_8 (5 мкм); элюент: трис(окснтимстил)аминометан (1 М, рН 10)/ацетонитрил (3:1)

Концентрация хлорида натрия в элюенте, моль/л	Орнипрессин	Лизин-вазопрессин	Окситоцин
0	∞	∞	2,4
0,05	2,2	2,9	2,3

Таблица 5.14. Пределы обнаружения окситоцина и его производных [80]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: RP 8 (10 мкм); элюент: фосфатный буфер (рН 7,0)/ацетонитрил (4:1); объем пробы: 34 мкл (водного раствора); отношение сигнал/шум: 3:1

Соединение	Коэффициент емкости	Предел обнаружения	Длина волны детектора, нм
Окситоцин	3,6	30	210
Демокситоцин	9,9	40	215
Орнипрессин	1,3	75	215
Лизин вазопрессин	1,3	30	215

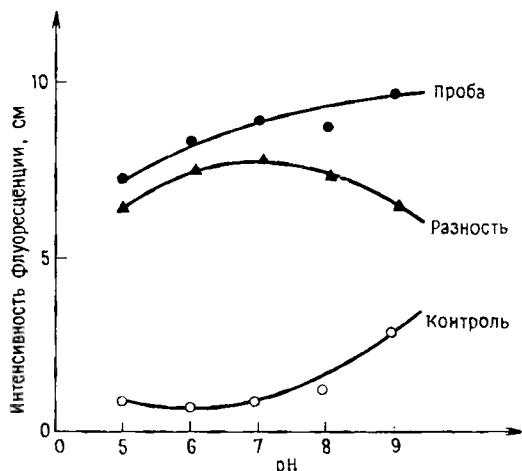


Рис. 5.23. Влияние pH на флуоресцентную реакцию пробы с окситоцином [2].
Условия реакции: фосфатный буфер + H_3PO_4 или NaOH до необходимого значения pH: 3 мл смеси буфер/ацетонитрил (80 : 20) + 100 мкл раствора окситоцина (5 межд. ед./мл) + +300 мкл флуорескамина (300 мг/100 мл ацетонитрила).

Первичные аминогруппы нейрогипофизарных гормонов способны взаимодействовать с флуорескамином с образованием флуоресцирующих производных. Однако их флуоресценция сильно зависит от типа применяемого органического растворителя (рис. 5.22), величины pH элюента (рис. 5.23) и концентрации флуорескамина (рис. 5.24).

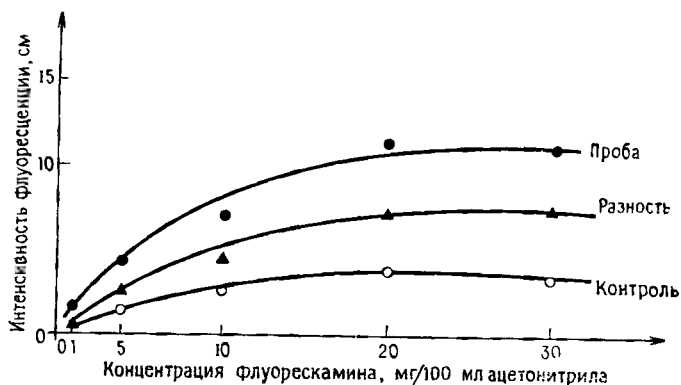


Рис. 5.24. Влияние концентрации флуорескамина на флуоресцентную реакцию с окситоцином [21].

Условия реакции: 3 мл смеси боратный буфер (pH 8,0)/ацетонитрил (80 : 20) + 100 мкл раствора окситоцина (5 межд. ед./мл) + 300 мкл флуорескамина (30 мг/100 мл ацетонитрила).

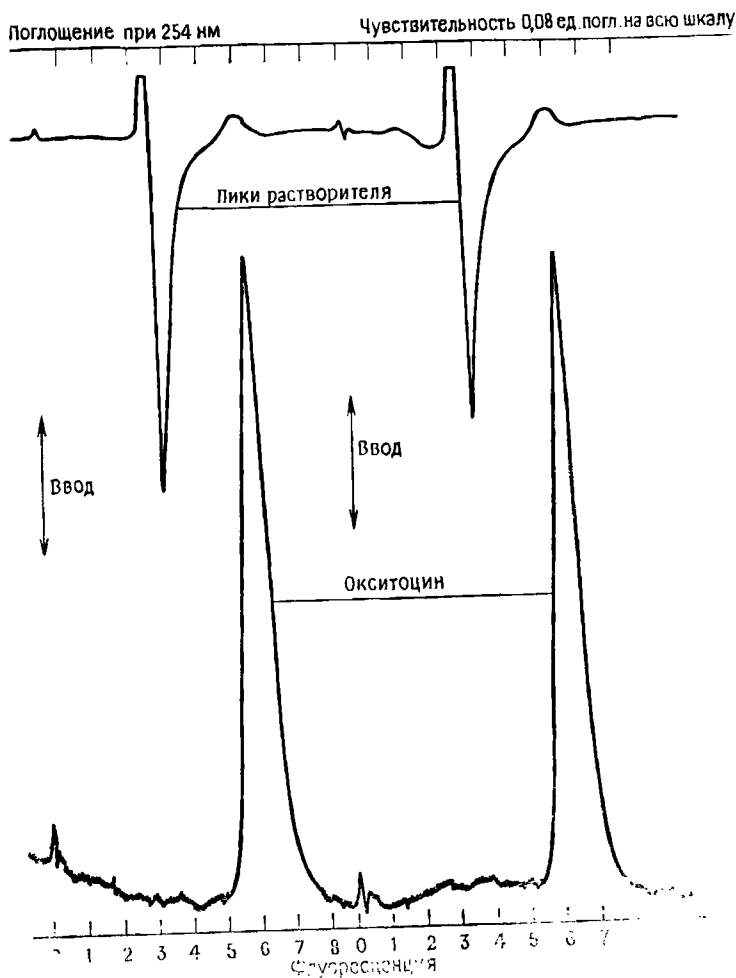


Рис. 5.25. Хроматограмма окситоцина (0,88 мкг в 2 мкл пробы) [2].

Сравнение методов обнаружения по поглощению в УФ-области (при 254 нм) и по флуоресценции после смешения с буфером или раствором флуорескамина. Колонка: 250X3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: Si 60, 10 мкм; элюент: тетрагидрофур/0,05 М уксусная кислота (2:1), объемная скорость: 0,28 мл/мин; объемная скорость подачи боратного буфера (pH 9,0) 0,85 мл/мин, флуорескамина (30 мг/100 мл ацетонитрила) 0,43 мл/мин.

Исходя из зависимостей, представленных на рис. 5.22—5.24, были подобраны следующие оптимальные условия обнаружения флуорескаминовых производных нейрогипофизарных гормонов по флуоресценции.

а. Концентрация флуорескамина от 20 до 30 мг/мл ацетонитрила дает оптимальный флуоресцентный сигнал.

б. Для того чтобы содержание органического растворителя было низким, раствор флуорескамина следует подавать с малыми объемными скоростями.

в. Значение рН элюента следует устанавливать в оптимальной области — от 6 до 8.

Таблица 5.15. Структура аденогипофизарных гормонов

Структура																				Название	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
H	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	АСТН
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			(человеческий)
Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	OH		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
H	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	АСТН
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			(свиной)
Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	OH		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
H	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	Gly	Lys	Lys	Arg	Arg	Pro	Val	АСТН
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39			(овечий)
Lys	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	Ala	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Phe	OH		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13								α -MSH	
H ₃ C	CO	Ser	Tyr	Ser	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Lys	Pro	Val	NH ₂						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			β -MSH (бычий)	
H	Asp	Ser	Gly	Pro	Tyr	Lys	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	OH		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			β -MSH (свиной)	
H	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Lys	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	OH		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			β -MSH (человеческий)	
H	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly	Ser			
Гликопротеин (2 субъединицы; α : 96 аминокислотных остатков; β : 120 аминокислотных остатков; мол. масса 26 000)																				ЛГ, ИКСГ (овечий, бычий)	
Гликопротеин (2 субъединицы; мол. масса ~30 000)																				ФСГ	
Протеин (198 аминокислотных остатков; мол. масса ~23 000)																				Пролактин (ЛТГ овечий)	
Протеин (190 аминокислотных остатков; мол. масса ~22 000)																				Гормон роста (ГР, человеческий)	
Гликопротеин (2 субъединицы; α : 96 аминокислотных остатков; β : 113 аминокислотных остатков; мол. масса 28 500)																				Тиреотропин (ТСГ, бычий)	

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
H-Glu-Leu-Ala-Gly-Ala-Pro-Pro-Glu-Pro-Ala-Arg-Asp-Pro-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-																		β-Липотропин	
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
Gly-Ala-Ala-Ala-Arg-Ala-Glu-Leu-Glu-Tyr-Gly-Leu-Val-Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Ala-Glu-																		(свиной)	
39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
Lys-Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-																			
59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Lys-Arg-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Glu-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-																			
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91							
Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln-NH ₂																			

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
H-Glu-Leu-Ala-Gly-Ala-Pro-Pro-Glu-Pro-Ala-Arg-Asp-Pro-Glu-Ala-Pro-Ala-Glu-Gly-																			γ-Липотропин
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Ala-Ala-Ala-Arg-Ala-Glu-Leu-Glu-Tyr-Gly-Leu-Val-Ala-Glu-Ala-Gln-Ala-Ala-Glu-Lys-																			(свиной)
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	
Lys-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH																			

Оптимальная подвижная фаза для разделения и обнаружения по флуоресценции — смесь буферный раствор (рН 7,0)/ацетонитрил в соотношении 80 : 17,5 для окситоцина и 80 : 15 для орнипрессина и лизин-вазопрессина. Одновременное обнаружение окситоцина по поглощению в УФ-области и по флуоресценции (рис. 5.25) ясно показывает преимущество метода послеколоночной модификации [2].

5.3.3. Аденогипофизарные гормоны

В передней доле гипофиза вырабатывается целый ряд гормонов, различающихся по структуре и молекулярной массе, в том числе тиротропин (ТСГ), аденокортикотропин (АКТГ), меланотропин (МСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ, гормон стимулирующий интерстициальные клетки), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), пролактин (лютеотропин, ЛТГ), гормон роста (ГР, соматотропин) и липотропин(ы) (ЛПГ). Структуры некоторых аденогипофизарных гормонов приведены в табл. 5.15.

5.3.3.1. Кортикотропин и меланотропин. В последние годы опубликовано много работ, в том числе и теоретических, посвященных разделению кортикотропинов [8, 14, 15, 43, 56, 61, 70—72, 80, 88—90] и меланотропинов [6, 14, 15, 43, 56, 61, 66, 71, 72, 91, 92] методом ВЭЖХ. Подробные условия разделения аденокортикотропных гормонов и меланоцитстимулирующих гормонов, включая их производные и фрагменты, приведены в табл. 5.16 и 5.17.

При разделении слабых органических кислот и оснований с использованием смесей вода/метанол (ацетонитрил) методом

Таблица 5.16. Условия разделения методом ВЭЖХ кортикотропных гормонов и их производных (структуры см. в табл. 5.15)

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
АКТГ человеческий					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутаисульфат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрила+50% 0,005 М тартратного буфера (рН 3,0)+0,01 М 1-бутаисульфат натрия+0,1 М сульфат натрия (2:3) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	А: 0,08%-ная трифторуксусная кислота, Б: ацетонитрил/0,08%-ная трифторуксусная кислота (49:51), градиент от 3,5 до 49% ацетонитрила за 20 мин (1 мл/мин)	3,9 < 300	УФ (206)	20,4 мин (время элюирования)	61
Партисил-ODS (10 мкм)	А: 1%-ная трифторуксусная кислота, Б: метанола/вода/трифторуксусная кислота (80:19:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	УФ (280)	—	8
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5 < 100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88
	Ацетонитрил/0,02 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками от 0 до 60% (1 мл/мин) ацетонитрила за 50 мин	5×100	УФ (225), флуоресценция (275/370)	30,5 мин (время удерж.)	14
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	А: 0,08%-ная трифторуксусная кислота Б: ацетонитрил/0,08%-ная трифторуксусная кислота (7:3), градиент от 30 до 50% Б (30 мин) (1 мл/мин)	3,9×300	УФ (206)	—	61
АКТГ (свиной)					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутаисульфат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрила+50% 0,005 М тартратного буфера (рН 3,0)+0,01 М 1-бутан-	4×200	УФ (220)	—	70

Гиперсил-ODS
(5 мкм)

сульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (2:3) (1 мл/мин) Ацетонитрил/0,02 М фосфатный буфер (pH 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	33,0 мин (вре- мя удерж.)	14
А: 0,2 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: ацето- нитрил, линейный градиент от А до Б (2% ацетонитрила/мин)	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	18,5 мин (вре- мя удерж.)	14
А: 0,2 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: тетра- гидрофуран, линейный градиент от А до Б, (2% тетрагидрофурана/мин)	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	20,6 мин (вре- мя удерж.)	14
А: 0,2 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: диок- сан, линейный градиент от А до Б (2% ди- оксана/мин)	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	25,4 мин (вре- мя удерж.)	14
А: 0,2 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: мета- нол, линейный градиент от А до Б (2% ме- танола/мин)	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	35,4 мин (вре- мя удерж.)	14
Ацетонитрил/0,1 М фосфатный буфер (pH 2,3), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	14
Ацетонитрил/0,1 М фосфатный буфер (pH 6,2), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	14
Ацетонитрил/0,16 М соляная кислота +хлорид натрия (pH 2,1), градиент с тремя линейны- ми участками (1 мл/мин), начиная с 0% аце- тонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	14
Ацетонитрил/0,1 М фосфорная кислота (pH 1,9), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	14

АКТГ (овечий иодированный)

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

А: 0,02 М триэтиламинфосфатный буфер (pH 3,0), Б: 0,02 М триэтиламинфосфатный буфер (pH 3,0)/2-пропанол (1:1), линейный гради- ент от А до Б за 75 мин (1 мл/мин)	—	УФ (210)	—	92
--	---	----------	---	----

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Лите- ратура
АКТГ ₁₋₃₂					
Нуклеосил 10 C ₁₈	16,7% ацетонитрил+83,3% метанол/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2), (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	7,5	86
	16,7% изопропанола в метаноле/0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2), (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	4,7	86
АКТГ ₁₋₂₈					
Нуклеосил 10 C ₁₈	16,7% ацетонитрил+83,3% метанол/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	10,6	86
	16,7% изопропанола в метаноле/0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2), 35:65 (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	10,0	86
АКТГ ₁₋₂₄ (пентаацетат)					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Метанол/0,1%-ная фосфорная кислота 2:3	4×300	УФ (225)	2,1 мин (время удерж.)	90
Нуклеосил 10 C ₁₈	16,7% ацетонитрила+83,3 метанол/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	13,9	86
	16,7% изопропанола в метаноле/0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	17,7	86
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил (4:1) (1 мл/мин)	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88
	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 < 100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	21,5 мин (время удерж.)	14

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

Партисил-ODS
(10 мкм)

μ-Бондапак C₁₈

А: 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1) Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до Б (2% ацетонитрила/мин)
 А: 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: тетрагидрофуран, линейный градиент от А до Б (2% тетрагидрофуран/мин)
 А: 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: диоксан, линейный градиент от А до Б (2% диоксана/мин)
 А: 0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: метанол, линейный градиент от А до Б (2% метанола/мин)
 Ацетонитрил/0,1 М фосфатный буфер (рН 2,3), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила
 Ацетонитрил/0,1 М фосфатный буфер (рН 6,2), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила
 Ацетонитрил/0,16 М соляная кислота+хлорид натрия (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила
 Ацетонитрил/0,1 М фосфорная кислота (рН 1,9), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), начиная с 0% ацетонитрила
 А: 0,08%-ная трифторуксусная кислота Б: ацетонитрил/0,08%-ная трифторуксусная кислота (7:3), градиент от 30 до 50% Б (30 мин) (1 мл/мин)
 А: 1%-ная трифторуксусная кислота Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота, 80:19:1, линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)
 Ацетонитрил/вода/50 мМ фосфатный буфер (рН 2,5), несколько циклов с 2%-ным увеличением содержания ацетонитрила (1 мл/мин)

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

13,6 мин (время удерж.)

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

13,0 мин (время удерж.)

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

15,4 мин (время удерж.)

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

26,0 мин (время удерж.)

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

—

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

—

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

—

14

5×100

УФ (225)
флуоресценция
(275/370)

—

14

3,9×300

УФ (206)

—

61

4×250

УФ (280)

—

8

—

УФ (254)

—

43

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
	А: вода+50 мМ монофосфат натрия+0,1%-ная фосфорная кислота, Б: ацетонитрил/вода+50 мМ монофосфат натрия (1:1)+0,1%-ная фосфорная кислота, линейный градиент от А до Б, (60 мин) (1 мл/мин)	—	УФ (254)	—	43
АКТГ ₁₋₂₄ (меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20:79:1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55:44:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₁₋₂₄ (сульфоксид, меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20:79:1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55:44:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₁₋₂₄					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88
АКТГ ₁₋₁₈					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88

АКТГ₁₋₁₈-NH₂

Неклеосил 5 C₁₈
(5 мкм)

0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратного буфера (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия, (68:32) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфоната натрия+0,1 М сульфат натрия (66:34) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (64:36)	4×200	УФ (220)	—	70

АКТГ₁₋₁₅ (меченный ³H)

Партисил-ODS
(10 мкм)

А: Метанол/вода/трифторуксусная кислота, 20:79:1, Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота, 55:44:1, линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
--	-------	-----------------	---	---

АКТГ₁₋₁₄

Нуклеосил 10 C₁₈

16,7% ацетонитрила+83,3% метанол/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	10,1	86
16,6% изопропанола в метаноле/0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35:65) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	9,1	86

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Лите- ратура
АКТГ 1-18					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин), от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 × 100	УФ (220) флуоресценция (275/370)	18,5 мин (вре- мя удерж.)	14
АКТГ 15-32					
Нуклеосил 10 C ₁₈	16,7% изопропанола в метаноле/0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35 : 65) (1 мл/мин)	4,6 × 250	УФ (215)	0	86
	16,7% ацетонитрил+83,3% метанол/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35 : 65) (1 мл/мин)	4,6 × 250	УФ (215)	1,5	86
АКТГ 4-10					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5 × 100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88
АКТГ 34-39					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5 × 100	УФ (225)	—	83
	Ацетонитрил/фосфатный буфер (рН 2,1), 6 : 19 (1 мл/мин)	5 × 100	УФ (225)	—	88
АКТГ 5-10					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 × 100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	17,0 мин (вре- мя удерж.)	14

АКТГ₄₋₁₀

Гиперсил-ODS (5 мкм)	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 × 100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	20,5 мин (вре- мя удерж.)	14
-------------------------	---	---------	--	------------------------------	----

АКТГ₁₈₋₃₉

Гиперсил-ODS (5 мкм)	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 × 100	УФ (225), флуоресценция (275/370)	30,5 мин (вре- мя удерж.)	14
-------------------------	---	---------	---	------------------------------	----

АКТГ₃₄₋₃₉

Гиперсил-ODS (5 мкм)	Ацетонитрил/0,2 М фосфатный буфер (рН 2,1), градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) от 0 до 60% ацетонитрила за 50 мин	5 × 100	УФ (225), флуоресценция (275/370)	31,0 мин (вре- мя удерж.)	14
-------------------------	---	---------	---	------------------------------	----

АКТГ₁₁₋₃₉ (человеческий)

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	А: 0,08%-ная трифторуксусная кислота, Б: аце- тонитрил/0,08%-ная трифторуксусная кислота (7:3), градиент от 30 до 50% Б (30 мин), (1 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (206)	—	61
--	---	-----------	----------	---	----

АКТГ₄₋₁₀

Партисил-ODS (10 мкм)	А: 1%-ная трифторуксусная кислота, Б: мета- нол/вода/трифторуксусная кислота (80:19:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4 × 250	УФ (280)	—	8
--------------------------	--	---------	----------	---	---

АКТГ₁₇₋₂₄ (меченный ³H)

Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20: 79:1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кис- лота (55:44:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4 × 250	Радиоактивность	—	8
--------------------------	--	---------	-----------------	---	---

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
АКТГ ₁₈₋₂₄ (меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20 : 79 : 1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55 : 44 : 1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₉₋₂₄ (меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20 : 79 : 1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55 : 44 : 1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₂₋₂₀ (меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20 : 79 : 1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55 : 44 : 1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₃₋₂₀ (меченный ³ H)					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: метанол/вода/трифторуксусная кислота (20 : 79 : 1), Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (55 : 44 : 1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	Радиоактивность	—	8
АКТГ ₁₈₋₃₉					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1)/ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками (1 мл/мин) до 60% ацетонитрила	5×100	УФ (225) флуоресценция (275/370)	—	88

(Gly ¹)-AKTГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (33:17) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(Gly ¹)-AKTГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (17:8) (1 мл/мин)	4 < 200	УФ (220)	—	70
	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(Gly ¹)-AKTГ ₁₋₁₈ -NH ₂ (сульфоксид)					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(β-Ala ¹)-AKTГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,01 М сульфат натрия (33:17) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Литература
	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (17:8) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(Aib ¹)-АКТГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 С ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (33:17) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(Ala ¹⁰)-АКТГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 С ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (17:8) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70

(D-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈ -NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

(Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₀ -NH-NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (11:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

(D-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₀ -NH-NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (11:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

(β-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈ -NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	k	Лите- ратура
(Aib ¹⁰)-АКТГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 С ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
(β-Ala ¹ ,D-Phe ⁷ ,Orn ¹⁵)-АКТГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 С ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	7.
(Gly ¹ ,Pro ³)-АКТГ ₁₋₁₈ -NH ₂					
Нуклеосил 5 С ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (17:8) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70

(Lys³,Ser¹¹)-АКТГ₁₋₁₈ -NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (17:8) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

(β-Ala¹,Orn¹⁵)-АКТГ₁₋₁₈ -NH₂

Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия/50% ацетонитрил + 50% 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (16:9) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
--	---	-------	----------	---	----

(D-Ser¹,Lys^{17,18})-АКТГ₁₋₁₈ -NH₂

Партисил-ODS (10 мкм)	А: 1%-ная трифторуксусная кислота, Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (80:19:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	УФ (280)	—	8
--------------------------	--	-------	----------	---	---

Таблица 5.17. Условия разделения методом ВЭЖХ меланотропинов и их производных (структуры см. в табл. 5.15)

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение, (нм)	Время удерживания, мин	Литература
α-МСГ					
Лихросорб RP-8 (5 мкм)	А: 0,01 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент специального профиля от А до Б (2 мл/мин)	4,6×250	УФ (200)	—	6
Гиперсил-ODS (5 мкм)	А: 0,02 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками от А до 60% Б (1 мл/мин)	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	26,0	14
Биорад-ODS	А: 0,1 М перхлорат натрия+5 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), Б: 0,1 М перхлорат натрия/ацетонитрил (2:3), линейный градиент от А до Б (0,75% ацетонитрила/мин)	—	УФ (220) или флуоресценция (флуорескамин)	46,2	15
	А: 0,1 М перхлорат натрия+0,1%-ная фосфорная кислота, Б: 0,1 М перхлорат натрия+0,1%-ная фосфорная кислота/ацетонитрил (2:3), от А до Б, линейный градиент (0,75% ацетонитрила/мин)	—	УФ (220) или флуоресценция (флуорескамин)	46,2	15
μ -Бондапак C ₁₈	А: вода+50 мМ фосфат натрия+0,1%-ная фосфорная кислота, Б: ацетонитрил/вода+50 мМ фосфат натрия+0,1%-ная фосфор-	—	УФ (254)	—	43

ная кислота (1:1), линейный градиент от А до Б, 60 мин (1 мл/мин)

Гель TSK-2000 SW
(10 мкм)

0,05 М натрий-фосфатный буфер (pH 7,2)/SDS (99,7:0,3) (0,3 мл/мин)

7,5×600

УФ (210 или 280)

15,2 (объем элюирования)

59

μ-Бондапак C₁₈
(10 мкм)

А: 0,08%-ная трифторуксусная кислота, Б: 49% ацетонитрила в 0,08%-ной трифторуксусной кислоте, линейный градиент от А до Б за 20 мин (1 мл/мин)

3,9×300

УФ (206)

18,9

61

Гиперсил-ODS
(5 мкм)

А: 0,1 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками от А до 60% Б за 50 мин

5×100

УФ (225)

—

88

μ-Бондапак C₁₈

А: 0,02 М триэтиламинфосфатный буфер (pH 3,0), Б: 0,02 М триэтиламинфосфатный буфер (pH 3,0)/2-пропанол (1:1), линейный градиент от А до Б за 75 мин (1 мл/мин)

—

УФ (210)

—

92

β-MCГ₁₃₋₂₂

Лихросорб RP-8
(5 мкм)

А: 0,1 М фосфатный буфер (pH 2,1), Б: ацетонитрил, градиент специального профиля от А до Б (2 мл/мин)

4,6×250

УФ (200)

—

6

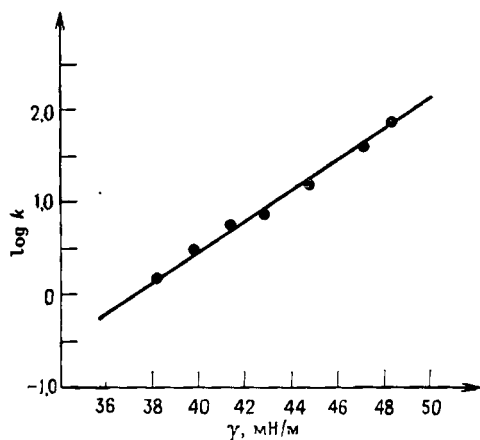


Рис. 5.26. График зависимости $\log k$ от величины поверхностного натяжения для АКТГ₁₋₂₄ [43].

Неподвижная фаза: μ -бондапак С₁₈; элюент: ацетонитрил/вода/50 мМ NaH₂PO₄ (рН 2,5 установлен добавлением ортофосфорной кислоты); объемная скорость: 1 мл/мин. Разделение проводилось в изократических условиях с увеличением концентрации на 2% при каждом последующем измерении.

обращенно-фазовой хроматографии имеет место следующее соотношение между коэффициентом емкости k и величиной поверхностного натяжения γ элюента [35]:

$$\log k_i = C + \gamma (N\Delta A + 4,836 N^{1/3} (k_e - 1) V_m^{2/3}) / RT$$

где ΔA — относительная площадь контакта молекулы растворенного соединения с поверхностью неподвижной фазы, C — константа, N — число Авогадро, k_e — микроскопический коэффициент емкости, V_m — средний молярный объем подвижной фазы, R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

Это линейное соотношение между $\log k$ и γ подтверждено экспериментально на примере разделения АКТГ₁₋₂₄ на обращенной-фазовой колонке с μ -бондапаком С₁₈ при элюировании смесью ацетонитрил/вода (рис. 5.26) [43].

Таблица 5.18. Влияние органических модификаторов подвижной фазы на время удерживания свиного АКТГ, АКТГ₁₋₂₄ и α -МСГ [14]

Колонка: 100×5 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: гиперсил-ODS (5 мкм); элюент: А — 0,2 М NaH₂PO₄/H₃PO₄ (рН 2,1), Б — органические растворители, указанные ниже; обнаружение: по поглощению в УФ-области (при 225 нм); органические растворители использовались в качестве второго компонента простого линейного градиента (50 мин) с постоянной скоростью изменения состава, равной 2%/мин

Пептид	Ацетонитрил	Тетрагидро-фуран	Диоксан	Метаноол
АКТГ ₁₋₂₄	13,6	13,0	15,4	26,0
АКТГ (свиной)	18,5	20,6	25,4	35,4
α -МСГ	15,2	15,4	18,0	28,4

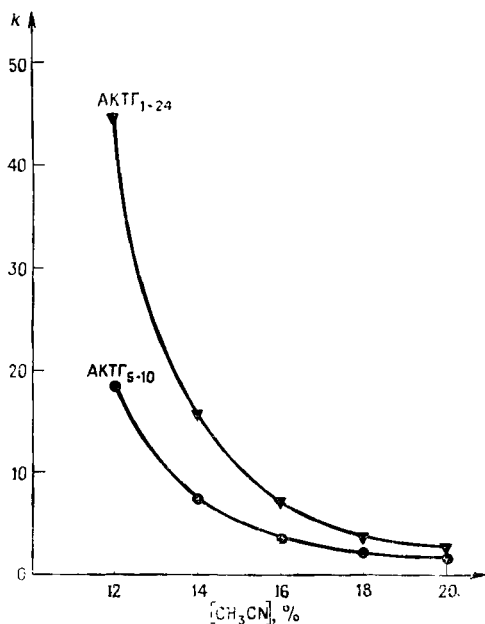


Рис. 5.27. Влияние концентрации ацетонитрила на значение k при разделении АКТГ₁₋₂₄ и АКТГ₅₋₁₀ методом ВЭЖХ [14]. Колонка: 100×5 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: гиперсил-ODS, 5 мкм; элюент: 0,2 М Na₂HPO₄—H₃PO₄ (рН 2,1)/ацетонитрил (концентрации различные, указаны на рисунке), изократическое элюирование; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 225 нм.

Время удерживания пептидов, имеющих структуру АКТГ, как и у других полипептидов, зависит от полярности органического модификатора подвижной фазы (табл. 5.18).

Эффективное разделение пептидов, молекулы которых близки по размерам к молекулам АКТГ, достигается только в том случае, если диапазон концентраций органического растворителя невелик. При более высоких концентрациях органического растворителя полипептиды элюируются очень быстро, а при низких концентрациях — прочно связываются с обращенной фазой, как это наглядно показано на рис. 5.27 на примере двух пептидов с аминокислотной последовательностью природного АКТГ.

Как уже говорилось в разд. 5.2.1, автор работы [15] предложил метод предсказания коэффициентов удерживания. С целью проверки применимости этого метода для изократического элюирования с использованием различных подвижных фаз были определены коэффициенты емкости ряда производных АКТГ. Последующее сравнение теоретически рассчитанных и экспериментально найденных значений этих коэффициентов показало их хорошее соответствие (табл. 5.19, рис. 5.28) [86].

Как видно из табл. 5.15, аминокислотные последовательности человеческого и свиного АКТГ отличаются только в положении 31. Остаток Leu в свином гормоне заменен на остаток Ser в человеческом. Успешное разделение этих гормонов при помо-

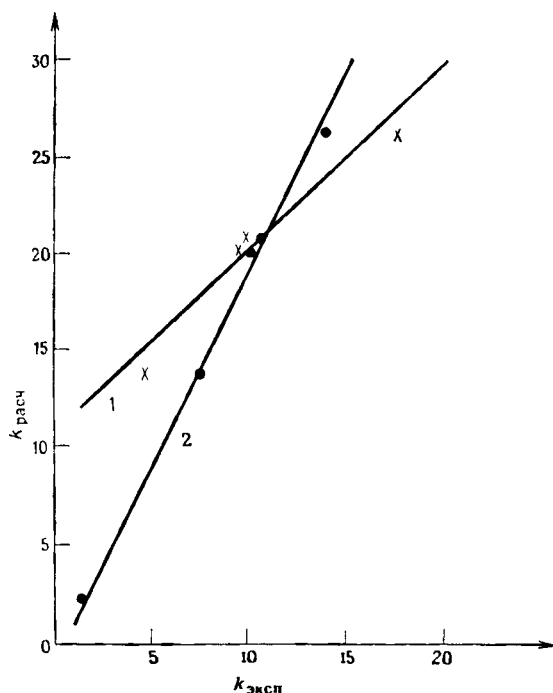


Рис. 5.28. Корреляция между экспериментально установленными и рассчитанными [15] значениями k для производных АКТГ (АКТГ₁₅₋₃₂, АКТГ₁₋₃₂, АКТГ₁₋₁₄, АКТГ₁₋₂₄ и АКТГ₁₋₂₈) [86].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: нуклеосил 10 С₁₈; элюенты: 1 — ацетонитрил/метанол (16,7 : 83,3)/0,1 М раствор сульфата натрия в 0,01 М фосфатном буфере, рН 2,2 (35 : 65), 2 — изопропанол/ацетонитрил (33,3 : 66,7)/0,1 М фосфатный буфер, рН 2,2 (4 : 6).

Таблица 5.19. Рассчитанные и экспериментально найденные коэффициенты емкости производных АКТГ [86]

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: нуклеосил 10 С₁₈; элюент I: ацетонитрил/метанол (16,7 : 83,3)/0,1 М сульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35 : 65), элюент II: изопропанол/метанол (16,7 : 83,3), 0,1 М перхлорат натрия в 0,01 М фосфатном буфере (рН 2,2) (35 : 65); объемная скорость 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению в УФ-области (при 215 нм); мертвое время колонки принято равным 2 мин

Соединение	Число ам- нокислотных остатков	$k_{\text{расч}}$ (рН 2,1)	$k_{\text{эксп}}$	
			элюент I	элюент II
АКТГ ₁₅₋₃₂	18	2,15	1,5	0
АКТГ ₁₋₃₂	32	13,8	7,5	4,7
АКТГ ₁₋₁₄	14	20,15	10,1	9,1
АКТГ ₁₋₂₄	24	26,25	13,9	17,7
АКТГ ₁₋₂₈	28	20,8	10,6	10,0



Рис. 5.29. Разделение свиного (1) и человеческого (2) АКТГ методом ВЭЖХ [70].

Колонка: 200×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: нуклеосил 5 С₁₈; элюент: А — 0,005 М тартарный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия, В — ацетонитрил/0,005 М тартарный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (1 : 1, 2 : 3 (А : В); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 220 нм.

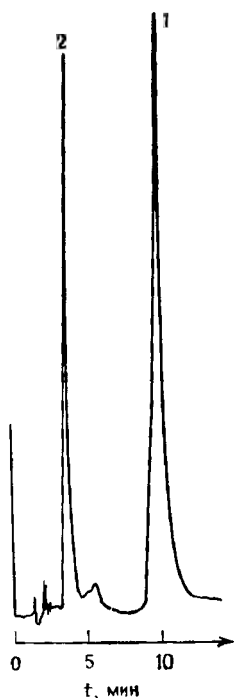


Рис. 5.30. Разделение (Gly¹)-АКТГ₁₋₁₈-NH₂ (1) и его сульфоксида (2) методом ВЭЖХ [70].

Условия разделения см. в подписи к рис. 5.29. Соотношение элюентов А : В равно 16 : 9.

щи ОФ-ВЭЖХ еще раз подтверждает высокую значимость этого метода в исследованиях пептидов [70].

В условиях, аналогичных приведенным на рис. 5.29 (содержание ацетонитрила в подвижной фазе соответственно 18 и 16%), наблюдалось хорошее разделение пяти производных АКТГ₁₋₁₈, отличающихся друг от друга всего на один аминокислотный остаток: (β-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈-NH₂, АКТГ₁₋₁₈-NH₂, (L-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈-NH₂, (D-Ala¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈-NH₂ и (Aib¹⁰)-АКТГ₁₋₁₈-NH₂ [70].

В процессе синтеза или выделения АКТГ остаток метионина в положении 4 может быть окислен до соответствующего сульфоксида. Для исследователей, занимающихся изучением пептидов, очень важна возможность разделения окисленных и восста-

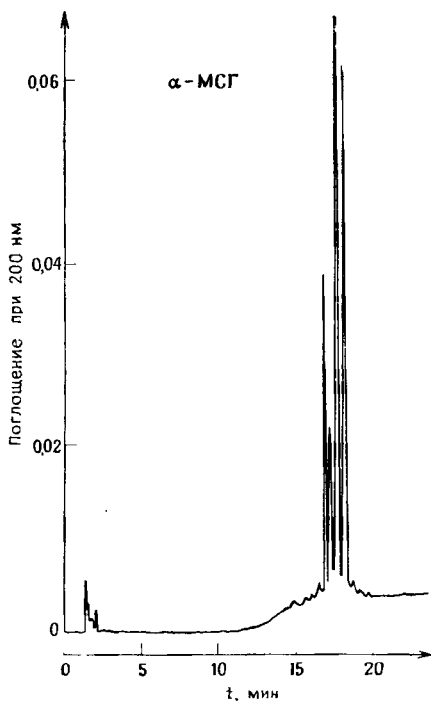


Рис. 5.31. Хроматограмма α -МСГ, очищенного традиционными методами [6].

Колонка: $250 \times 4,6$ мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: лихросорб RP-8, 5 мкм; элюент: А — 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б — ацетонитрил (от 0 до 100%); объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 200 нм.

новленных форм метионинсодержащих пептидов. Наиболее полно этим требованиям отвечает ВЭЖХ, и примером тому может служить хроматограмма, полученная при разделении $(\text{Gly}^1)\text{-АКТГ}_{1-18}\text{-NH}_2$ и соответствующего сульфоксида (рис. 5.30). Точно так же хроматограмма (рис. 5.31), полученная при разделении образца α -МСГ, очищенного традиционными методами, должна убедить каждого исследователя пептидов в том, что в настоящее время не существует лучшего метода контроля чистоты пептидов, чем высокоэффективная жидкостная хроматография. Природа отдельных пиков (рис. 5.31) «чистого» образца α -МСГ не установлена. Это могут быть различные конформеры, пептиды с различной последовательностью или производные, содержащие сульфоксид метионина.

ВЭЖХ все шире используется для выделения природных пептидов, таких, как АКТГ, и их производных из биологического материалов. Как установлено, через 2 мин после внутривенного введения крысам АКТГ₁₋₂₄, меченного ^3H по аминокислотным остаткам 2, 7 и 23, основные продукты, циркулирующие в крови, — это исходный пептид и соответствующий сульфоксид. Меньшие количества АКТГ₁₇₋₂₄, АКТГ₁₈₋₂₄, АКТГ₉₋₂₄, АКТГ₁₋₂₀, АКТГ₂₋₂₀, АКТГ₃₋₂₀ и АКТГ₁₋₁₅ образуются под действием пеп-

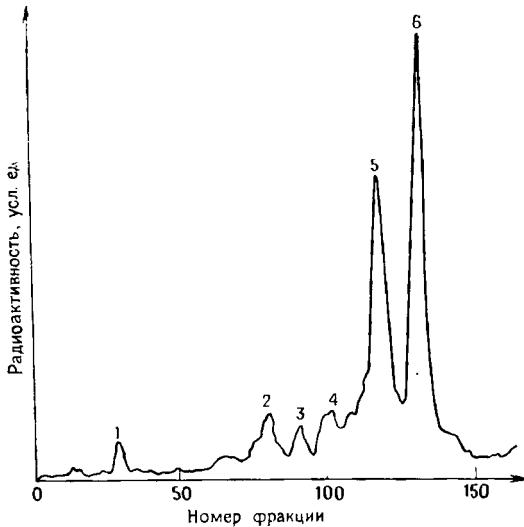


Рис. 5.32. Разделение ^3H -меченых пептидов плазмы крыс методом ВЭЖХ [8].

Подготовка пробы. Плазма взята у десяти крыс через 2 мин после введения ^3H -меченого АКТГ₁₋₂₄. Экстракты плазмы были приготовлены путем депротенизации плазмы равным объемом 30%-ной трифторуксусной кислоты и очисткой надосадочной жидкости пропусканием через колонку с 0,5 мл октадецилсилилсферисорба (10 мкм); элюент: 3×0,5 мл 1%-ной трифторуксусной кислоты и 0,5 мл смеси метанол/вода/трифторуксусная кислота (80 : 19 : 1).

Условия разделения ВЭЖХ. Колонка: 250×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил ODS, 10 мкм; элюент: метанол/вода/трифторуксусная кислота, линейное градиентное элюирование смеси от 20 : 79 : 1 до 55 : 44 : 1; объемная скорость: 0,7 мл/мин; обнаружение: по радиоактивности (условная шкала) в порциях по 10 мкл.
1 — АКТГ₁₇₋₂₄ и АКТГ₃₋₂₀; 2 — АКТГ₉₋₂₄; 3 — АКТГ₁₋₂₀, АКТГ₂₋₂₀ и АКТГ₃₋₂₀; 4 — АКТГ₁₋₁₅; 5 — АКТГ₁₋₂₄-сульфоксид; 6 — АКТГ₁₋₂₄.

тидаз. Эти результаты имеют огромное значение в свете использования биологически активных пептидов в медицине [8].

В работе [61] описаны успешное выделение методом ВЭЖХ и идентификация методом радиоиммуноанализа С-концевых фрагментов АКТГ из средней доли гипофиза крыс. Разделение авторы этой работы проводили на колонке размером 300×3,9 мм (внутр. диаметр), заполненной μ -бондапаком C₁₈.

5.3.3.2. Лютеинизирующий гормон (ЛГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), пролактин, гормон роста (ГР) и липотропин (ЛПГ). В настоящее время число публикаций, посвященных разделению аденогипофизарных гормонов белковой природы относительно мало [14, 56, 61, 88, 93—95]. Структуры этих гормонов приведены в табл. 5.15, а экспериментальные условия их разделения методом ВЭЖХ — в табл. 5.20. Вплоть до настоящего времени в этих целях использовались две различные методики ВЭЖХ: обращенно-фазовая [14, 56, 61, 88, 89,

Таблица 5.20. Условия разделения методом ВЭЖХ аденогипофизарных гормонов белкового происхождения

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	Время удерживания, мин
Лютеинизирующий гормон [93]				
Гель TSK-3000 SW	0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 7,0) (0,5 мл/мин)	7,5×300	УФ (216)	—
Фолликулостимулирующий гормон [93]				
Гель TSK-3000 SW	0,1 М натрий-ацетатный буфер (рН 7,0) (0,5 мл/мин)	7,5×300	УФ (216)	—
Пролактин крысиный [94]				
Лихросорб RP-2 (от 5 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	17,3 (отн. лизоцима)
Ультрасфер SAC (от 4 до 6 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	25,0 (отн. лизоцима)
Сферисорб S5T6 (от 3 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	20,0 (отн. лизоцима)
Лихросорб RP-8 (от 4 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	29,1 (отн. лизоцима)
Пролактин овечий [94]				
Лихросорб RP-2 (от 5 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	3 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	13,1 (отн. лизоцима)
Ультрасфер SAC (от 4 до 6 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено НCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	3 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	16,7 (отн. лизоцима)

Сферисорб S5C6 (от 3 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено HCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	3 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	16,6 (отн. лизоцима)
Лихросорб RP-8 (от 4 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено HCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	3 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	16,6 (отн. лизоцима)

Гормон роста человеческий [93]

Гель TSK-2000 SW	0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,0) (0,5 мл/мин)	7,5 × 300	УФ (210)	—
Гель TSK-3000 SW	0,1 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,0) (0,5 мл/мин)	7,5 × 300	УФ (216)	—

Гормон роста бычий [94]

Лихросорб RP-2 (от 5 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено HCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	17,3 (отн. лизоцима)
--------------------------------	--	---------	--	----------------------

Гормон роста бычий [94]

Ультрасфер SAC (от 4 до 6 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено HCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	29,0 (отн. лизоцима)
Лихросорб RP-8 (от 4 до 7 мкм)	А: 0,155 М хлорид натрия (рН 2,1, установлено HCl), Б: ацетонитрил, линейный градиент от А до 75% Б за 90 мин (1 мл/мин)	5 × 150	УФ (215 или 280) или флуоресценция (225/340 или 280/370)	39,4 (отн. лизоцима)

β-Липотропин человеческий [14]

Гиперсил-ODS (5 мкм)	А: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент от А до 60% Б за 50 мин с тремя линейными участками	5 × 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	34,5
----------------------	---	---------	--------------------------------------	------

β-Липотропин [61]

μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Линейный градиент от 3,5 до 49% ацетонитрила, содержащего 0,08% трифторуксусной кислоты за 20 мин (1 мл/мин)	3,9 × 300	УФ (206)	21,4
-------------------------------------	--	-----------	----------	------

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	Время удержи- вания, мин
γ-Липотропин [61]				
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Линейный градиент от 3,5 до 49% ацетонитрила, содержащего 0,08% трифторуксусной кислоты за 20 мин (1 мл/мин)	3,9 < 300	УФ (206)	19,5
β-Липотропин 34 -39 овечий [14]				
Гиперсил-ODS (5 мкм)	А: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент от А до 60% Б, три линейных участка за 50 мин	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	8,5
β-Липотропин 34—39 [88]				
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), элюирование ацетонитрилом (градиент с тремя линейными участками до 60% ацетонитрила за 50 мин)	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	—
β-Липотропин 61—65 (Met-энкефалин) [88]				
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), элюирование ацетонитрилом (градиент с тремя линейными участками до 60% ацетонитрила за 50 мин)	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	—
β-Липотропин 61—76 (α-эндорфин) [88]				
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), элюирование ацетонитрилом (градиент с тремя линейными участками до 60% ацетонитрила за 50 мин)	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	—
β-Липотропин 61—91 (β-эндорфин) [88]				
Гиперсил-ODS (5 мкм)	0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), элюирование ацетонитрилом (градиент с тремя линейными участками до 60% ацетонитрила за 50 мин)	5 < 100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	—

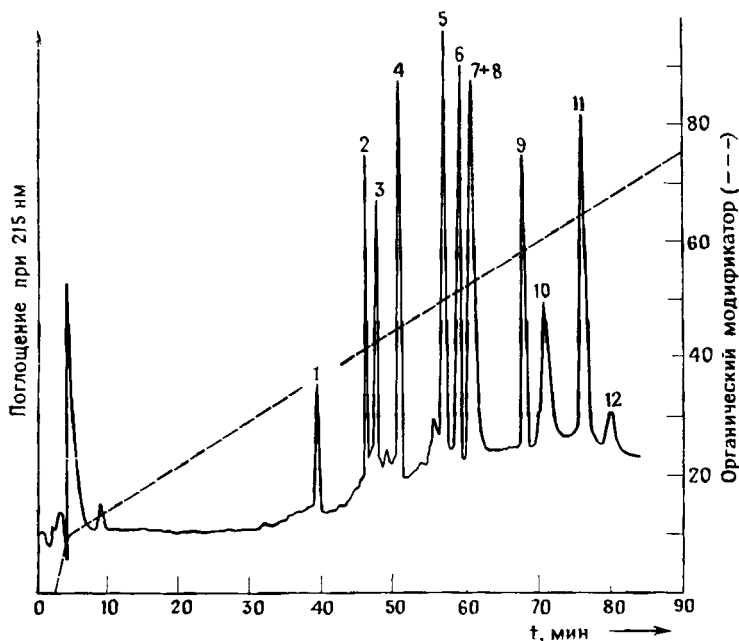


Рис. 5.33. Разделение смеси 12 белков, включая гормон роста и пролактин, методом ВЭЖХ [94].

Неподвижная фаза: ультрасфер SAC, 4–6 мкм; элюент: линейный градиент ацетонитрила в 0,155 M растворе хлорида натрия (pH 2,1); объемная скорость: 1 мл/мин; температура: 45 °C; обнаружение: по поглощению при 215 нм; 1 — рибонуклеаза А из поджелудочной железы быка, тип III А; 2 — кальцитонин синтетический человеческий; 3 — цитохром с из сердца лошади, тип III; 4 — лизоцим из яичного белка; 5 — α -лактальбумин бычий; 6 — карбангидраза из бычьих эритроцитов; 7 — эластаза из поджелудочной железы свиньи, тип III; 8 — β лактоглобулин А из коровьего молока; 9 — пролактин овечий P-S-13; 10 — человеческий плацентарный лактоген; 11 — пролактин крысиный PRL-B-2; 12 — гормон роста бычий GH-B-18.

94, 95] и гель-проникающая хроматография [93]. В фундаментальной работе Найса и др. [94] показано, что белки можно успешно разделять на неподвижных фазах на основе силикагеля, модифицированного алкилсиланами с короткими углеродными цепями. В табл. 5.21 приведены характеристики ряда неподвижных фаз такого типа.

Время удерживания различных белков, в том числе пролактина (крысиного и овечьего) и гормона роста, на колонках с неподвижной фазой на основе силикагеля, модифицированного алкилсиланами с короткими углеродными цепями, указано в табл. 5.22. Эффективность разделения белков на таких неподвижных фазах демонстрирует рис. 5.33. Хотя многие белки слишком гидрофобны и не разделяются в указанных условиях (табл. 5.22, рис. 5.33), в сочетании с гель-проникающей и ионо-

Таблица 5.21. Характеристики неподвижных фаз на основе силикагеля, модифицированного алкилсиланами с короткими углеродными цепями, используемых для разделения белков методом ВЭЖХ [94]

Неподвижная фаза	Длина угле- родной цепи	Размер ча- стиц, мкм	Диаметр пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверхность, м ² /г	Форма частиц
Лихросорб RP-2	1	От 5 до 7	—	—	500	Произвольная
Ультрасфер SAC	3	От 4 до 6	8	0,57	180	Сферическая
Сферисорб S5C6	6	От 3 до 7	8	0,57	200	Сферическая
Лихросорб RP-8	8	От 4 до 7	—	—	>250	Произвольная

Таблица 5.22. Относительное время удерживания белков (лизоцим=0), определенное методом ВЭЖХ [94]

Колонки: 150×5 мм (внутр. диаметр); неподвижные фазы, модифицированные алкилсиланами с короткими углеродными цепями: указаны в таблице; элюент: А — 0,155 М раствор NaCl (рН 2,1, установлено HCl), Б — ацетонитрил, линейный градиент от 0 до 75% Б в течение 90 мин; объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению в УФ-области (при 215 нм)

Белок	Молекулярная масса	Лихросорб RP-2	Ультрасфер SAC	Сфеисорб S5C6	Лихросорб RP-8
Рибонуклеаза А (поджелудочная железа быка, типа IIIA)	14 200	—10,2	—10,7	—11,3	—12,0
Фактор роста эпидермиса (мышинный)	6 000	—	—7,6	—8,0	—
Кальцитонин (синтетический, человеческий)	3 400	—4,1	—4,4	—4,1	—5,0
Цитохром с (из сердца лошади, тип III)	11 700	—2,5	—3,1	—2,3	—3,8
Гормон паращитовидной железы (бычий)	9 500	—2,4	—2,3	—2,1	—2,6
Лизоцим (из яичного белка)	14 300	0	0	0	0
Бычий сывороточный альбумин (фракция V)	68 000	3,2	3,3	5,8	7,2
Человеческий сывороточный альбумин	66 500	3,8	3,5	—	—
α-Лактальбумин (бычий)	14 200	4,6	7,4	6,6	7,2
α-Лактальбумин (крысиный)	14 200	4,9	—	7,9	—
Многлобин	17 200	7,1	9,0	9,5	8,9
α-Гемоглобин (бычий)	15 100	8,2	9,2	9,6	11,3
Карбоангидраза (из эритроцитов быка)	29 000	9,8	9,5	9,6	10,0
β-Лактоглобулин А (коровье молоко)	18 300	10,1	10,0	—	8,8
β-Лактоглобулин В (коровье молоко)	18 300	10,1	10,0	—	8,8
Эластаза (поджелудочная железа свиньи, тип IIIA)	25 900	11,1	10,0	11,7	—
Пролактин (овечий P-S-13)	22 600	13,1	16,7	16,6	16,6
Человеческий плацентарный лактоген	22 100	14,3	20,2	17,6	18,5
Пролактин (крысиный PRL-B-2)	22 600	17,3	25,0	20,0	29,1
Гормон роста (бычий GH-B-18)	22 000	17,3	29,0	—	39,4

Таблица 5.23. Корреляция между порядком элюирования белков и их гидрофобностью при разделении методов ВЭЖХ [94]

Неподвижная фаза: силикагель, модифицированный алкилсиланами с короткой углеводной цепью; прочие условия разделения см. в подписи к рис. 5.33; гидрофобности (моль. %) рассчитана с учетом Trp, Phe, Leu, Ile, Tyr, Val и Met

Белок	Молекулярная масса	Гидрофобность, моль. %	Порядок элюирования
Рибонуклеаза А	13 700	21,8	1
Цитохром с	11 700	25,0	2
Лизоцим	14 300	26,4	3
Человеческий сывороточный альбумин	66 500	28,37	4
Бычий сывороточный альбумин	69 000	32,0	5
α -Лактальбумин (бычий)	14 200	32,5	6
Карбоангидраза	29 000	31,49	7
α -Гемоглобин	15 100	31,20	8
Многлобин	17 200	31,37	8
Эластаза	25 900	32,5	10
β -Лактоглобулин	18 300	34,6	10
Пролактин (овечий)	22 600	32,8	12
Человеческий плацентарный лактоген	22 100	33,7	13
Гормон роста (бычий)	22 000	34,0	14

обменной хроматографией данный метод дает хорошие результаты.

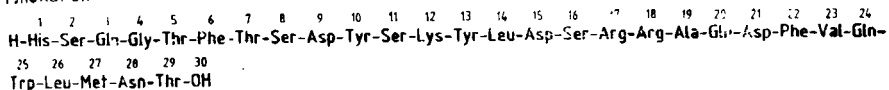
При сравнении порядка элюирования белков с их гидрофобностью (табл. 5.23) можно вывести общую закономерность. Возникающие аномалии следует отнести за счет возможных конформационных эффектов.

Хорошей альтернативой обращенно-фазовой хроматографии на неподвижных фазах на основе силикагеля с химически привитыми алкилсиланами с короткими углеводными цепями служит высокоэффективная гель-проникающая хроматография при условии использования материалов, устойчивых к действию внешнего давления [93, 96—101]. Авторы работы [93] применили высокоэффективную гель-проникающую хроматографию для очистки гормонов гликопротеиновой природы — фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и человеческого хорионического гонадотропина (ЧХГ), а также белкового гормона роста [93].

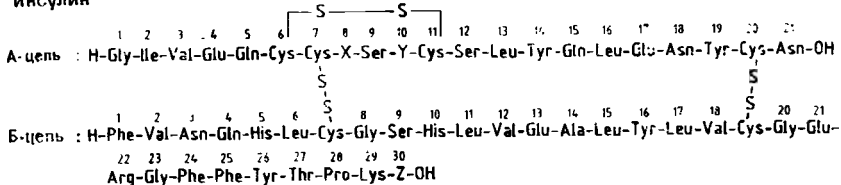
5.3.4. Гормоны поджелудочной железы

В поджелудочной железе вырабатываются два типа гормонов: клетки α -типа продуцируют глюкагон, а биосинтез инсулина происходит в клетках β -типа. Структуры обоих гормонов изображены на рис. 5.34.

Глюкагон



Инсулин



Инсулин	А-Цепь		В-Цепь	
	X	Y	Z	
Человеческий	Thr	Ile	Thr	
Свиной	Thr	Ile	Ala	
Бычий	Ala	Val	Ala	

Рис. 5.34. Аминокислотная последовательность глюкагона и инсулинов.

Разделению методом ВЭЖХ инсулина [7, 8, 14, 15, 43, 56, 59, 70, 71, 86, 90, 102, 104, 105] и глюкагона [8, 14, 15, 50, 56, 59, 66, 90, 103, 106] посвящено очень большое число работ (экспериментальные условия см. в табл. 5.24).

Обращенно-фазовая хроматография — один из наиболее распространенных методов быстрого определения степени чистоты инсулина. Метод позволяет регистрировать примеси в большинстве коммерчески доступных образцов [70]. Несмотря на то что человеческий инсулин отличается от свиного всего на один аминокислотный остаток в положении В30, а свиной инсулин в свою очередь отличается от бычьего на два аминокислотных остатка, эти три гормона можно легко отделить один от другого (рис. 5.35).

Порядок элюирования структурно близких инсулинов определяется гидрофобностью входящих в их состав аминокислотных остатков. Однако конформационные эффекты могут привести к нарушению порядка элюирования. Тип и концентрация органического модификатора подвижной фазы, а также ее ионная сила оказывают существенное влияние на характер разделения инсулинов методом ВЭЖХ.

Разделение бычьего и свиного инсулинов на колонке с нуклеосилом 10 C₁₈ (250×4,6 мм внутр. диаметр) возможно только при добавлении сульфата натрия (0,1 моль/л) в подвижную фазу (метанол/ацетонитрил/0,01 М фосфатный буфер

Таблица 5.24. Условия разделения методом ВЭЖХ инсулинов и глюкагона

Неподвижная фаза	Элюент	Колонка, мм	Обнаружение (нм)	Время удерживания, мин	Температура
Инсулин свиной					
Партисил-ODS (10 мкм)	А: 1%-ная трифторуксусная кислота, Б: метанол/вода/трифторуксусная кислота (80:19:1), линейный градиент от А до Б (0,7 мл/мин)	4×250	УФ (280)	—	8
Нуклеосил 10 C ₁₈	Метанол/ацетонитрил/фосфатный буфер (рН 2,2)+0,1 М сульфат натрия (5:1:4)	4,6×250	УФ (215)	—	86
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	А: 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия, Б: ацетонитрил (50%)+0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия (41,6:58,4) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
Гель TSK-2000 SW (10 мкм)	0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,2)/SDS (99,7:0,3) (0,3 мл/мин)	7,5×600	УФ (210 или 280)	14,6 (объем элюирования)	59
Инсулин бычий					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	А: 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия, Б: ацетонитрил (50%)+0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (41,6:58,4) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
Нуклеосил 10 C ₁₈	Метанол/ацетонитрил/фосфатный буфер (рН 2,2) (5:1:4) (1 мл/мин)	4,6×250	УФ (215)	—	86
Гиперсил-ODS (5 мкм)	А: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками от А до 60% Б (от 1 до 1,5 мл/мин)	5×100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	32,0	14
(Thr) ³⁰ -инсулин бычий					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	А: 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия, Б: ацетонитрил (50%)+0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (41,6:58,4) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70

Инсулин человеческий					
Нуклеосил 5 C ₁₈ (5 мкм)	А: 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,005 М сульфат натрия, Б: ацетонитрил (50%)+0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,01 М 1-бутансульфонат натрия +0,1 М сульфат натрия (41,6 : 58,4) (1 мл/мин)	4×200	УФ (220)	—	70
Инсулин					
μ-Бондапак C ₁₈ (10 мкм)	Метанол/0,1%-ная фосфорная кислота, 3 : 2	4×300	УФ (225)	6,0	90
Нуклеосил 10 C ₁₈	А: 0,05 М однозамещенный фосфат калия/2-метоксэтанол (рН 2,0, установлено фосфорной кислотой) (95 : 5), Б: изопропанол/2-метоксэтанол (рН 2,0, установлено фосфорной кислотой) (95 : 5), линейный градиент от 90 до 50% А	4×300	УФ (280)	—	102
Глюкагон					
Гиперсил-ODS (5 мкм)	А: 0,1 М фосфатный буфер (рН 2,1), Б: ацетонитрил, градиент с тремя линейными участками от А до 60% Б (от 1 до 1,5 мл/мин)	5×100	УФ (225) или флуоресценция (275/370)	36,0	14
Биорад-ODS (10 мкм)	А: 0,1 М перхлорат натрия+5 мМ фосфатный буфер (рН 7,4), Б: 0,1 М перхлорат натрия/60%-ный ацетонитрил, линейный градиент от А до Б (0,75% ацетонитрила/мин)		УФ (200 или 220) или флуоресценция (флуорескамин)	53,6	15
	А: 0,1 М перхлорат натрия+5 мМ фосфатный буфер+0,1%-ная фосфорная кислота (рН 2,1), Б: 0,1 М перхлорат натрия+0,1%-ная фосфорная кислота/60%-ный ацетонитрил, линейный градиент от А до Б (0,75% ацетонитрила/мин)		УФ (200 или 220) или флуоресценция (флуорескамин)	60,0	15
Гель TSK-2000 (10 мкм)	0,05 М натрий-фосфатный буфер (рН 7,2)/SDS (99,7 : 0,3) (0,3 мл/мин)	7,5×600	УФ (210 или 280)	14,8 объем элюирования)	59
Бондапак C ₁₈ Корасил	Метанол/0,1%-ная фосфорная кислота (2 : 3)	4×300	УФ (225)	4,6	90
Полигосил C ₁₈ (10 мкм)	Метанол/вода/трифторуксусная кислота (65 : 35 : 0,1) (1,2 мл/мин)	4×300	УФ (205)	—	103



Рис. 5.35. Хроматограмма очищенного бычьего (Thg-B³⁰), бычьего, человеческого и свиного инсулинов, полученная методом ВЭЖХ [70].

Колонка: 200×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: нуклеосил 5 С₁₈, 5 мкм; элюент: А — 0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,005 М 1-бутансульфонат натрия+0,05 М сульфат натрия, Б — ацетонитрил (50%)/0,005 М тартратный буфер (рН 3,0)+0,1 М 1-бутансульфонат натрия+0,1 М сульфат натрия (50%), А : Б—41,6 : 58,4; объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 220 нм.

(рН 2,2, 5:1:4) [86]. Коэффициенты емкости инсулинов возрастают в ряду изопропанол — тетрагидрофуран — ацетонитрил — метанол, если элюирование ведется смесью метанол/Х (органический растворитель)/0,1 М перхлорат натрия (табл. 5.25).

Длительное использование обращенно-фазовых колонок, особенно для разделения пептидов с большим молекулярным весом, приводит к снижению их эффективности, однако путем силирования обращенно-фазового носителя хлордиметилдоктадецилсианом в толуоле можно вновь получить относительно хорошее разделение [103].

При разделении методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии на относительно недавно разработанных неподвижных фазах, содержащих додецилсульфат натрия (TSK 2000 SW), пептиды и белки с молекулярной массой >5000 должны элюироваться в последовательности, определяемой размером их молекул. Однако пептиды типа инсулина (5782) и глюкагона (3485) в этой системе разделяются по другому механизму [59].

Таблица 5.25. Коэффициенты емкости бычьего и свиного инсулинов при элюировании с применением органических растворителей [86]

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: нуклеосил 10 С₁₈; элюент: метанол /Х/ 0,1 М перхлорат натрия (рН 2,2) (5 : 1 : 4)

Инсулин	Изопропанол	Тетрагидро- фуран	Ацетонитрил	Метанол
Бычий	0,17	1,01	2,69	4,23
Свиной	0,18	1,95	4,10	9,10

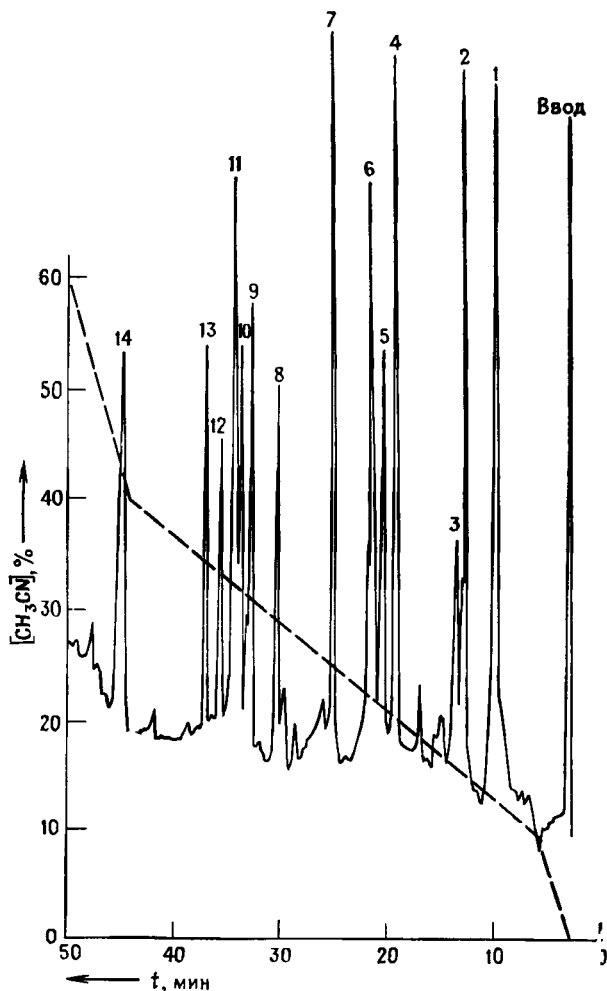


Рис. 5.36. Разделение смеси 13 полипептидов методом ВЭЖХ [14].

Колонка: 100×5 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: гиперсил-ODS, 5 мкм; элюент: А — 0,1 М однозамещенный фосфат натрия/фосфорная кислота (рН 2,1), суммарная концентрация фосфата 0,2 моль/л, В — ацетонитрил, профиль градиента показан на рисунке штриховой линией; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 225 нм; проба: от 1 до 10 мкг каждого полипептида и 50 нг триптофана в качестве внутреннего стандарта в исходном растворе.

1 — триптофан; 2 — лизин-вазопрессин; 3 — аргинин-вазопрессин; 4 — окситоцин; 5 — АКТГ₁₋₂₄; 6 — инсулин А; 7 — бомбезин; 8 — вещество Р; 9 — соматостатин; 10 — инсулин В; 11 — человеческий кальцитонин; 12 — глюкагон; 13 — кальцитонин дорсы; 14 — мелитин.

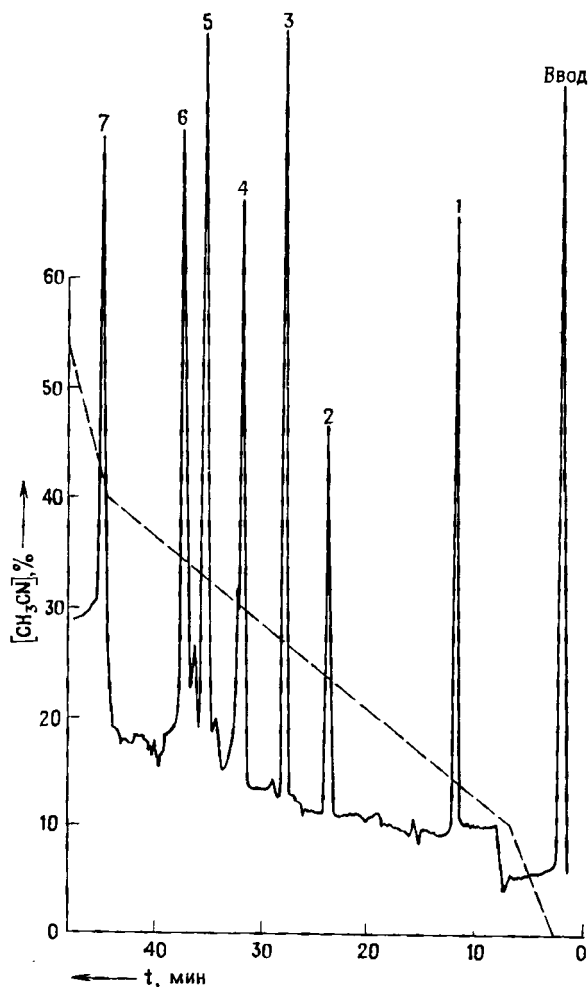


Рис. 5.37. Разделение смеси 6 белков методом ВЭЖХ [14].

Условия разделения см. в подписи к рис. 5.36.

1 — триптофан; 2 — нейротоксин 3 кобры; 3 — рибонуклеаза А; 4 — инсулин; 5 — цитохром с; 6 — лизоцим; 7 — миоглобин.

5.3.5. Гормоны другого происхождения

Методы ВЭЖХ, подобные описанным в предыдущих разделах, были использованы для разделения нейропептидов типа ангиотензинов [6, 15, 43, 52, 72, 90, 107], бомбезина [14, 66], нейротензина [14, 15, 66], вещества Р [14, 43, 64, 71], гормонов типа кальцитонина [52, 71, 89, 108, 109], гормона парашитовидной железы [110], секретина [111], пептидов с предпологаемым гор-

Таблица 5.26. Объемы элюирования V_e , значения k и молекулярные массы образцов, разделенных на колонке (600×7,5 мм) с гель-TSK 2000 SW (10±2 мкм) при элюировании 0,05 М натрий-фосфатным буфером (рН 7,2) с 0,3% додецилсульфата натрия с объемной скоростью 0,3 мл/мин; обнаружение проводилось по поглощению в УФ-области при 280 нм [59]

Проба	V_e , мл	k	Молекулярная масса
Ферритин (V_0)	12,6	0	480 000
Овальбумин	12,6	0	45 000
α -Химотрипсिनоген А	13,2	0,058	25 700
Цитохром с	14,5	0,183	12 400
Апротинин	14,5	0,183	6520
Инсулин (свиной)	14,6	0,192	5782
Глюкагон	14,8	0,211	3485
Тетракозактид	14,8	0,211	2934
α -Эндорфин	15,9	0,317	1746
Нейротензин	15,0	0,231	1673
α -Меланоцитостимулирующий гормон	15,2	0,250	1665
Соматостатин	15,4	0,270	1638
Вещество Р	15,1	0,240	1348
Лютеинизирующего гормона рилизинг-фактор	14,9	0,221	1182
Брадикинин	15,2	0,250	1060
Ангиотензин I	15,0	0,231	1297
Ангиотензин II	15,8	0,308	1046
Ангиотензин III	15,6	0,288	931
Окситоцин	15,0	0,250	1007
Вазопрессин	15,2	0,250	1056
Arg-вазотоцин	15,3	0,260	1022
β -Казоморфин	17,5	0,471	790
β -Казоморфин (1—5)	19,0	0,615	580
Тимопоэтинактивный фрагмент (32—36)	16,8	0,404	680
Met-энкефалин	20,2	0,731	574
Leu-энкефалин	19,0	0,615	556
Тафцин	16,4	0,365	501
Аргинин	21,0	0,808	174
Аланин	23,0	1,000	89
Другие аминокислоты	>22,8	—	—

мональным действием типа пептида, вызывающего сон [52], тафцина [15, 112] или тироимитирующих йодированных аминокислот [113—117].

В последовательном синтезе секретина и его аналогов ОФ-ВЭЖХ (лихросорб RP-18, 10 мкм, 300×4 мм) служила прекрасным методом очистки конечного целевого продукта и всех промежуточных соединений [111].

Изучение возможности использования ВЭЖХ на неподвижных фазах на основе силикагеля, модифицированного алкилсианом (гиперсил ODS), для разделения пептидов и белков с

молекулярной массой до 65 000 с сохранением их биологической активности привело к весьма впечатляющим результатам (рис. 5.36 и 5.37) [14].

Более или менее эффективное разделение пептидов и белков в большом диапазоне молекулярной массы можно проводить методом гель-проникающей хроматографии в присутствии додецилсульфата натрия на колонках с недавно разработанным носителем гель TSK 2000 SW (табл. 5.26) [59].

Порядок элюирования соединений с молекулярной массой вплоть до 50 000 соответствует размерам молекул пробы. Таким образом, молекулярную массу белков и пептидов в диапазоне 1000—45 000 можно определять исходя из объема элюирования.

Литература

1. Molnar I., Horvath C., in Goodman M., Meienhofer J. (Eds.): Peptides, p. 48, Halsted, New York, 1977.
2. Frei R. W., Michel L., Santi W. J. Chromatogr., **126**, 665 (1976).
3. Krummy K., Frei R. W. J. Chromatogr., **132**, 27 (1977).
4. Rivier J. E. J. Liq. Chromatogr., **1**, 343 (1978).
5. Voelter W., Echner H. неопубликованные данные.
6. Molnar I., Horvath C. J. Chromatogr., **142**, 623 (1977).
7. Gabriel T. F., Michalewski J. E., Meinhofer J., in: Gross E., Mienhofer J. (Eds.): Peptides, Structure and Biological Function, p. 105. Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1979.
8. Bennet H. P. J., Hudson A. M., McMartin C., Purdon G. E. Biochem. J., **168**, 9 (1977).
9. Kronbach T., Voelter W. неопубликованные данные.
10. Lundanes E., Greibrokk T. J. Chromatogr., **149**, 241 (1978).
11. Lindeberg G. J. Chromatogr., **193**, 427 (1980).
12. Schrode J., Folk J. E. J. Biol. Chem., **253**, 4837 (1978).
13. Majors R. E. Analysis, **10**, 549 (1974).
14. O'Hare M. J., Nice E. C. J. Chromatogr., **171**, 209 (1979).
15. Meek J. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 1632 (1980).
16. Gribnau T. C. J., Visser J., Nirard R. J. F. Affinity Chromatography and Related Techniques, Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam, 1982.
17. Radhakrishnan A. N., Stein S., Licht A., Gruber K. A., Udenfried S. J. Chromatogr., **132**, 552 (1977).
18. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
19. Voelter W., Zech K. J. Chromatogr., **112**, 643 (1975).
20. Voelter W. Pure Appl. Chem., **48**, 105 (1976).
21. Roth M., Hampai A. J. Chromatogr., **83**, 353 (1973).
22. Benson J. R., Hare P. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 619 (1975).
23. Kraas E., Voelter W. неопубликованные данные.
24. Greaser E. H., Hughes G. J. J. Chromatogr., **144**, 69 (1977).
25. Wittmer D. F., Nuessle N. O., Haney W. G. Anal. Chem., **47**, 1422 (1975).
26. Sood S. P., Sartori L. E., Wittmer D. P., Haney W. G. Anal. Chem., **48**, 796 (1975).
27. Knox J. H., Laird G. R. J. Chromatogr., **122**, 17 (1976).
28. Knox J. H., Jurand J. J. Chromatogr., **125**, 89 (1976).
29. Kraak J. C., Jonker K. M., Huber J. F. K. J. Chromatogr., **142**, 671 (1977).
30. Voelter W., Zech K., Arnold P., Ludwig G. J. Chromatogr., **199**, 345 (1980).

31. *Fransson B., Wahl K.-G., Johansson I. M., Schill G. J.* Chromatogr., **125**, 327 (1976).
32. *Terweij-Groen C. P., Heemstra S., Kraak J. C. J.* Chromatogr., **161**, 69 (1978).
33. *Hoffmann N. E., Liao J. C.* Anal. Chem., **49**, 2231 (1977).
34. *Tomlinson E., Jefferies T. M., Riley C. M. J.* Chromatogr., **159**, 315 (1978).
35. *Horvath C., Melander W., Molnar I. J.* Chromatogr., **125**, 129 (1976).
36. *Horvath C., Melander W., Molnar I., Molnar P.* Anal. Chem., **49**, 2295 (1977).
37. *Kissinger P. T.* Anal. Chem., **49**, 883 (1977).
38. *Van de Venne J. L. M., Hendrikx J. L. H. M., Deelder R. S. J.* Chromatogr., **167**, 1 (1978).
39. *Scott R. P. W., Kucera P. J.* Chromatogr., **175**, 51 (1979).
40. *Deelder R. S., Linssen H. A. J., Konijnendijk A. P., van de Venne J. L. M.* J. Chromatogr., **185**, 241 (1979).
41. *Hearn M. T. W., Grego B., Hancock W. S. J.* Chromatogr., **185**, 429 (1979).
42. *Hearn M. T. W., Hancock W. S.*, in: Hawk J. (Ed.): Biological-Biomedical Applications of Liquid Chromatography II, p. 243, Marcel Dekker, New York, 1978.
43. *Hearn M. T. W., Grego B. J.* Chromatogr., **203**, 349 (1981).
44. *Voelter W., Bauer H., Kronbach T.* неопубликованные данные.
45. *Voelter W.* Chem. Ztg., **98**, 554 (1974).
46. *Gupta D., Voelter W.* Hypothalamic Hormones — Structure, Synthesis and Biological Activity; Verlag Chemie, Weinheim, 1975.
47. *Gupta D., Voelter W.* Hypothalamic Hormones — Chemistry, Physiology and Clinical Applications. Verlag Chemie, Weinheim-New York, 1978.
48. *Fuchs S., Voelter W.* неопубликованные результаты.
49. *Guillemin R., Brazeau P., Böhlen P., Esch F., Ling N., Wehrenberg W. B.* Science, **218**, 585 (1982).
50. *Burgus R., Rivier J.*, in: A. Loffet (Ed.): Peptides, p. 85, Editions de l'Université de Bruxelles, Bruxelles, 1976.
51. *Hansen J. J., Greibrokk T., Gurrie B. L., Nils-Gunnar Johansson K., Folkers K. J.* Chromatogr., **135**, 155 (1977).
52. *Feldman J. A., Cohn M. L., Blair D. J.* Liquid Chromatogr., **1**, 833 (1978).
53. *Wünsch E.*, in: Rosselin G., Fromageot P., Bonfils S. (Eds.): Hormone Receptors in Digestion and Nutrition, p. 115, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979.
54. *Hui K.-S., Salschutz M., Davis B. A., Lajtha A. J.* Chromatogr., **192**, 341 (1980).
55. *Desiderio D. M., Stein J. L., Cunningham M. D., Sabbatini J. Z. J.* Chromatogr., **195**, 369 (1980).
56. *Regnier F. E., Gooding K. M.* Anal. Biochem., **103**, 1 (1980).
57. *Chang R. C. C., Huang W.-Y., Redding T. W., Arimura A., Coy D. H., Schally A. V.* Biochim. Biophys. Acta, **625**, 266 (1980).
58. *Mabuchi H., Nakahashi H. J.* Chromatogr., **213**, 275 (1981).
59. *Sugden K., Hunter C., Lloyd-Jones J. G. J.* Chromatogr., **204**, 195 (1981).
60. *Desiderio D. M., Yamada S., Tanzer F. S., Horton J., Trimble J. J.* Chromatogr., **217**, 437 (1981).
61. *McDermott J. R., Smith A. I., Biggins J. A., Ghyad Al-Noaemi M., Edwardson J. A. J.* Chromatogr., **222**, 371 (1981).
62. *Spindel E., Pettibone D., Fisher L., Fersntrom J., Wurtman R. J.* Chromatogr., **222**, 381 (1981).
63. *Hui K.-S., Hui M., Cheng K.-P., Lajtha A. J.* Chromatogr., **222**, 512 (1981).
64. *Feldman J. A., Cohn M. L.* Chromatogr. Sci. (Biol. Biomed. Appl. Liq. Chromatogr.), **10**, 225 (1979).
65. *Spindel E., Wurtman R. J. J.* Chromatogr., **175**, 198 (1979).
66. *Meek J. L.*, in: Costa E., Trabucchi M. (Eds.): Neural Peptides and Neural Communications, p. 145, Raven Press, New York, 1980.

- also *Repetitive Chemistry*, p. 143, Walter 1981.
69. Voelter W., Bauer H., Fuchs S., Pietrzik E. J. *Chromatogr.*, **169**, 69 (1978).
70. Terabe S., Konaka R., Inouye K. J. *Chromatogr.*, **172**, 163 (1979).
71. Bennett H. P. J., Browne C. A., Solomon S. J. *Liq. Chromatogr.*, **3**, 135 (1980).
72. Hearn M. T. W., Bishop C. A., Hancock W. S., Harding D. R. K., Reynolds G. D. J. *Liq. Chromatogr.*, **2**, 1 (1979).
73. Gesellchen P. D., Tajur S., Shields J. E., in: Gross E., Meienhofer J. (Eds.): *Peptides*, p. 117, John Wiley, New York, 1979.
74. Abrahamsson M., Groningsson K. J. *Liq. Chromatogr.*, **3**, 495 (1980).
75. Kalbacher H., Voelter W., in: Voelter D., Weitzel G. (Eds.): *Structure and Activity of Natural Peptides*, p. 383, Walter de Gruyter and Co., Berlin — New York, 1981.
76. Voelter W., in: Beers R. F., Bassett E. G. (Eds.): *Polypeptide Hormones*, p. 135, Raven Press, New York, 1980.
77. Kastin A. J., Barbeau A. *Can. Med. Assoc.*, 107 (1972).
78. Von Gerstenbrand F., Binder H., Kozman C., Pusch S., Reismar R. *Wien. Klin. Wochenschr.*, **87**, 883 (1975).
79. Gruber K. A., Stein S., Brink L., Radhakrishnan A., Udenfriend S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1314 (1976).
80. Krummen K., Frei R. W. *J. Chromatogr.*, **132**, 429 (1977).
81. Live D. H., in: Goodman M., Meienhofer J. (Eds.): *Peptides*, p. 44, John Wiley, New York, 1977.
82. Larsen B., Viswanatha V., Chang S. Y., Hruby V. J. *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 207 (1978).
83. Larsen B., Fox B. L., Burke M. F., Hruby V. J. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **13**, 12 (1979).
84. Nachtmann F. J. *Chromatogr.*, **176**, 391 (1979).
85. Blevins D. D., Burke M. F., Hruby V. J. *Anal. Chem.*, **52**, 420 (1980).
86. Gazdag M., Szepesi G. J. *Chromatogr.*, **218**, 603 (1981).
87. Bakalyar S. R., McIlwrick R., Roggendorf E. J. *Chromatogr.*, **142**, 353 (1977).
88. Nice E. C., O'Hare M. J. *J. Chromatogr.*, **162**, 401 (1979).
89. Bennett H. P. J., Browne C. A., Goltzman D., Solomon S., in: Gross E., Meienhofer J. (Eds.): *Peptides*, p. 121, John Wiley, New York, 1979.
90. Hancock W. S., Bishop C. A., Prestidge R. L., Harding D. R. K., Hearn M. T. W. *Science*, **200**, 1168 (1978).
91. O'Donohue T. L., Charlton C. G., Hilke C. J., Jacobowitz D. M., in: Gross E., Meienhofer J. (Eds.): *Peptides*, p. 897, John Wiley, New York, 1979.
92. Seidah N. G., Dennis M., Corvol P., Rochemont J., Chretien M. *Anal. Biochem.*, **109**, 185 (1980).
93. Calam D. H., Davidson J. J. *Chromatogr.*, **218**, 581 (1981).
94. Nice E. C., Capp M. W., Cooke N., O'Hare M. J. *J. Chromatogr.*, **218**, 569 (1981).
95. Kronbach T., Voelter W. *неопубликованные результаты*.
96. Regnier F. E., Noel R. J. *Chromatogr. Sci.*, **14**, 316 (1976).
97. Rokushika S., Ohkawa T., Hatano H. J. *Chromatogr.*, **176**, 456 (1979).
98. Gruber K. A., Whitaker J. M., Morris M. *Anal. Biochem.*, **97**, 176 (1979).
99. Roumeliotis P., Unger K. K. *J. Chromatogr.*, **185**, 445 (1979).
100. Renc B., Einarsson R. J. *Chromatogr.*, **197**, 278 (1980).
101. Kato Y., Komiya K., Sawada Y., Sasaki H., Hashimoto T. J. *Chromatogr.*, **190**, 305 (1980).
102. Mönch W., Dehnen W. J. *Chromatogr.*, **147**, 415 (1978).
103. Olieman C., Sedlick E., Voskamp D. J. *Chromatogr.*, **207**, 421 (1981).

104. Hearn M. T. W., Hancock W. S., Hurrell J. G. R., Fleming R. J., Kemp B. J. *Liq. Chromatogr.*, **2**, 919 (1979).
105. Hearn M. T. W., Grego B. J. *Chromatogr.*, **218**, 479 (1981).
106. Meek J. L., Rossetti Z. L. J. *Chromatogr.*, **211**, 15 (1981).
107. Tonnder J. A. D. M., Verhoe J., Wiegant V. M., De Jong W. J. *Chromatogr.*, **183**, 303 (1980).
108. Nice E. C., O'Hare M. J. *Anal. Proc. (London)*, **17**, 526 (1980).
109. Lambert P. W., Roos B. A. J. *Chromatogr.*, **198**, 293 (1980).
110. Zanelli J. M., O'Hare M. J., Nice E. C., Corran P. H. J. *Chromatogr.*, **223**, 59 (1981).
111. Bakkm J. T. M., Beyerman H. C., Hoogerhout P., Olieman C., Voskamp D. *Rec. J. Royal Netherlands Chem. Soc.*, **96**, 301 (1977).
112. Amoscato A. A., Babcock G. F., Nishioka K. J. *Chromatogr.*, **205**, 179 (1981).
113. Hearn M. T. W., Hancock W. S., Bishop C. A. J. *Chromatogr.*, **157**, 337 (1978).
114. Skellern G. G., Mahmoudian M., Knight B. I. J. *Chromatogr.*, **179**, 213 (1979).
115. Hearn M. T. W., Hancock W. S. J. *Chromatogr. Sci.*, **18**, 288 (1980).
116. Su S.-J., Grego B., Hearn M. T. W., J. *Liq. Chromatogr.*, **4**, 1709 (1981).
117. Brine G. A., Boldt K. G., Coleman M. L., Rapaka R. S. *Anal. Lett.*, **15**, 923 (1982).

Биогенные амины

К. Зех (K. Zech)

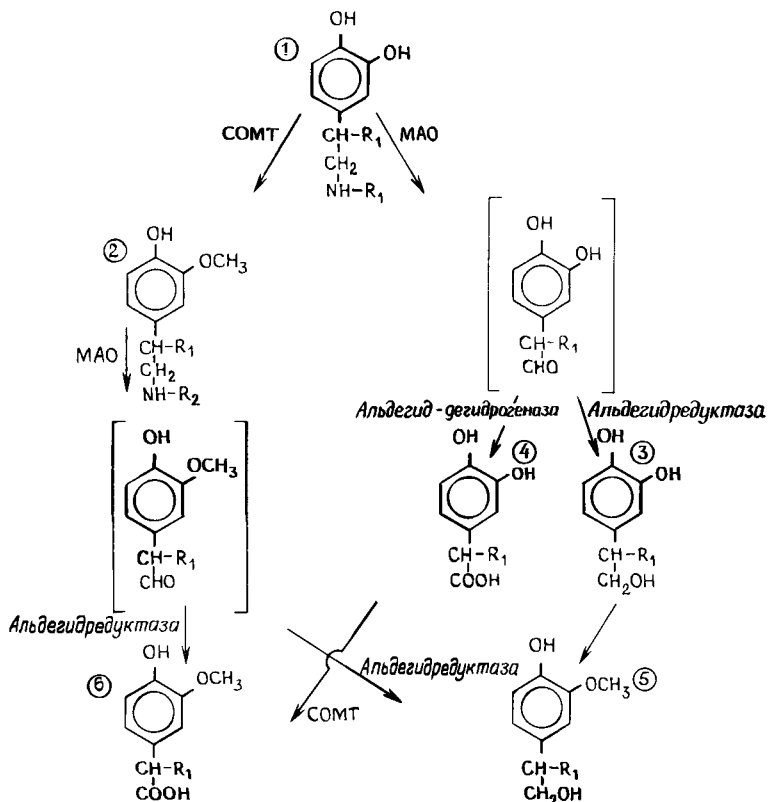
6.1. Введение

В состав клеток и внеклеточных жидкостей живых организмов входят сложные смеси веществ, содержащих аминогруппы, например пептиды, аминокислоты, амины. В последние 25 лет было выделено и идентифицировано много различных эндогенных аминов и аминокислот. Большой интерес в связи с этим вызывают, в частности, катехоламины — соединения, содержащие 3,4-дигидроксифенильное (пирокатехиновое) кольцо и боковую группу — этиламиновою или этаноламиновою, гистаминовую, холиновую, ацетилхолиновую, индолную.

Современное направление, которое развивается теперь в аналитической химии, предусматривает изучение метаболизма и функций, а также структуры и взаимосвязи соединений, выделенных из одной и той же пробы. Например, исследование метаболизма триптофана включает аналитический контроль триптофана, 5-гидрокситриптофана, 5-гидрокситриптамина, триптамина, N,N-диметилтриптамина, N,N-диметил-5-гидрокситриптамина (буфотенина), N-ацетил-5-метокситриптамина (мелатонина), индолилуксусной кислоты и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты, а также конъюгатов этих метаболитов (рис. 6.1).

Кроме ароматических аминов типа пирокатехина или индола в последние два десятилетия большой интерес вызывают алифатические полиамины, образующиеся в результате декарбоксилирования L-орнитина — аминокислоты, содержащей две аминогруппы. Образующийся диамин путресцин участвует в биосинтезе полиаминов спермидина и спермина. Эти алифатические амины и их производные (например, диаминопропан, кадаверин, гистамин) — природные метаболиты, содержащиеся практически во всех живых организмах [1, 2].

К настоящему времени о биологических функциях соединений этого класса известно относительно немного. Процессы роста сопровождаются увеличением активности фермента орнитиндекарбоксилазы [3], при раковых заболеваниях ускоряется биосинтез полиаминов. Авторы многих исследований пытались

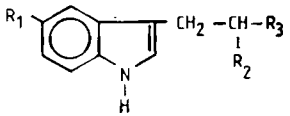


R_1	H	OH	OH
R_2	H	H	CH ₃
1	Дофамин	Норэпинефрин	Эпинефрин
2	3-О-Метилдофамин	Норметанефрин	Метанефрин
3	Дигидроксифенилэтанол	Дигидроксифенилэтиленгликоль	
4	Дигидроксифенилуксусная кислота	Дигидроксиминдальная кислота	
5	3-Метокси-4-гидроксифенилэтанол	3-Метокси-4-гидроксифенилэтилен-гликоль	
6	Гомованилиновая кислота	3-Метокси-4-гидроксиминдальная кислота	

Рис. 6.1. Пути метаболизма катехоламинов.

Участвующие ферменты: моноаминоксидаза (MAO), катехол-О-метилтрансфераза (COMT), альдегид-дегидрогеназа и альдегидредуктаза.

Таблица 6.1. Структура и сокращенные названия катехол-, индол- и полиаминов и их производных

Соединение	Структура	Сокращенное название	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Дофамин		3-H-Tyrm	ОН	ОН	Н	Н	Н	Н
Норэпинефрин (норадреналин)		NE	ОН	ОН	ОН	Н	Н	Н
Эпинефрин (адреналин)		E (EPI)	ОН	ОН	ОН	Н	Н	CH ₃
3,4-Дигидроксифенилаланин		DOPA	ОН	ОН	Н	Н	COOH	Н
Метанефрин		MN (M)	ОН	OCH ₂	ОН	Н	Н	CH ₃
Норметанефрин		NM	ОН	OCH ₃	ОН	Н	Н	Н
Синефрин		Syn	ОН	Н	ОН	Н	Н	CH ₃
Норсинефрин		NSyn	ОН	Н	ОН	Н	Н	Н
Тирамин		Tyrm	ОН	Н	Н	Н	Н	Н
3-Метокситирамин		3-M-Tyrm	ОН	O H ₃	Н	Н	Н	Н
3,4-Дигидрооксифенилуксусная кислота		DOPAC	ОН	ОН	Н	Н	Н	COOH
Гомованилиновая кислота		HVA	ОН	OCH ₃	Н	Н	Н	COOH

3,4-Дигидроксиминдальная кислота

Ванилилминдальная кислота

2,5-Дигидроксифенилуксусная кислота

3-Метокси-4-гидрокси-фенилгликоль

5-Гидрокситриптофан

Серотонин

5-Гидроксиндол-3-уксусная кислота

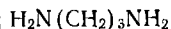
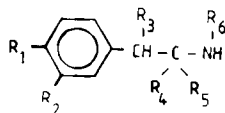
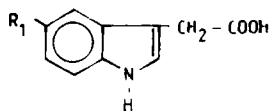
1,3-Диаминопропан

1,4-Диаминобутан (путресцин)

1,5-Диаминопентан (кадаверин)

Спермидин

Спермин



DOMA

VMA

HGA

MHPG

5-HTP

5-HT

5-HIAA

PUT

CAD

SPD

SPM

OH

H

H

H

OH

OCH₃

H

OCH₃

OH

OH

H

OH

OH

OH

H

H

OH

H

OH

COOH

COOH

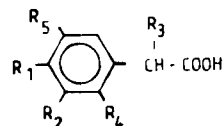
COOH

COOH

CH₂OH

COOH

H



установить, существует ли зависимость между концентрацией полиаминов и скоростью опухолевого роста [4—8], и, более того, **выяснить, можно ли соединения этого класса использовать в качестве индикаторов эффективности хемотерапии раковых заболеваний** [5, 9, 10]. Хотя во многих случаях исследователей может интересовать преимущественно какой-либо один амин, тем не менее техника анализа должна быть достаточно совершенной, так как концентрации биогенных аминов, как правило, исключительно малы, а анализируемый образец содержит множество соединений, близких по свойствам к изучаемому, и примерно в такой же концентрации. Как показали исследования, жидкостная хроматография в сочетании с новыми методами обнаружения относится к числу наиболее важных методов анализа биогенных аминов.

Концентрация биогенных аминов в биологических объектах, например в тканях и сыворотке, как правило, очень низка. Например, содержание аминов в ткани (влажная масса) менее 10 нмоль/г или 0,1—0,5 мкг/л в сыворотке вполне обычно [11, 12]. Очевидно, что потребность в определении низких концентраций биогенных аминов в биологических жидкостях, отдельных участках мозга и популяциях клеток стимулирует разработку соответствующих аналитических методов. Одинаково большое значение имеют повышение специфичности хроматографического разделения и совершенствование методов обнаружения. Постоянное совершенствование аналитических методик часто приводит к уточнению концентрационных уровней биогенных аминов, установленных разработанными ранее менее совершенными способами, поскольку действительные уровни концентрации во многих случаях оказывались значительно ниже установленных. Пересмотр уровней содержания β -гидрокси- γ -аминомасляной кислоты [13, 14], путресцина [15, 16] и холина/ацетилхолина [17] в животных тканях служит тому примером.

Ввиду неоднородного распределения и неоднозначных функций биогенных аминов в центральной нервной системе необходимы такие аналитические методики, которые позволяли бы анализировать отдельные участки мозга. В связи с этим помимо хроматографических методик были разработаны методы анализа, основанные на специфических ферментативных реакциях, часто предусматривающие использование радиоактивных субстратов, а также иммунологические методы [18, 19].

Например, для определения катехоламинов [20—28], серотонина [29, 30], β -фенилэтиламина [31, 32], гистамина [30—35], холина и ацетилхолина [36, 41] и путресцина [16] разработаны ферментативные методы с использованием радиоактивной метки (радиоферментативные методы). Усовершенствование этих методов было проведено главным образом Да Прада и Цюрхером [83]. Определение норадреналина и адреналина (нор- и

эпинефрина) было осуществлено с чувствительностью и специфичностью, сравнимыми с получаемыми методом хромато-масс-спектрометрии. Радиоферментативный метод основан на использовании реакции метилирования адреналина и норадреналина, катализируемой ферментом катехол-О-метилтрансферазой (COMT) в присутствии S-аденозилметионина (^3H -метил), в результате которой образуются метанефрин и норметанефрин. Определение проводится ион-парной экстракцией с последующим разделением полученных метоксиаминов методом ТСХ, их селективным окислением, введением тритиевой метки и обнаружением методом сцинтилляционной спектрометрии эпинефрина и норэпинефрина. Эта методика, позволяющая также проводить точное определение дофамина, была значительно улучшена путем замены ТСХ на ВЭЖХ, что сделало возможной ее частичную автоматизацию [84, 88].

Важный шаг вперед в области анализа биогенных аминов был сделан в последние несколько лет благодаря быстрому совершенствованию колоночной жидкостной хроматографии и разработке новых методов обнаружения, пригодных для применения в этом виде хроматографии. Если с появлением электронзахватных и масс-спектрометрических детекторов газовая хроматография стала высокочувствительным, селективным и гибким методом, позволяющим решать различные аналитические задачи [42—55], то к существенному совершенствованию ВЭЖХ привело применение флуориметрических и электрохимических детекторов [56—75]. Электрохимические методы используются в основном для обнаружения катехоламинов, хотя они также пригодны для обнаружения некоторых индолов.

Следует отметить, что применению электрохимических детекторов в рутинном анализе препятствует ряд проблем. Так, например, в литературе прослеживается значительное варьирование пределов обнаружения дофамина: от 500 [76], 200 [68], 100 [78], 53 [79], 20 [77] до 15 пг [80]. Эти причины в известной степени способствовали разработке оптических методов обнаружения, например флуоресцентных или хемилюминесцентных [82].

В литературе описано лишь считанное число примеров одновременного определения большого числа биогенных аминов и их метаболитов, а также родственных им соединений в одной пробе. Объясняется это тем, что трудно подобрать такую методику анализа, которая позволила бы провести определение всех перечисленных соединений. Очень сложно также подобрать соответствующие методики предварительной обработки пробы, отделения необходимого компонента от матрицы и его обнаружения.

6.2. Методы подготовки проб

Единой общей методики подготовки проб для выделения биогенных аминов методом жидкостной хроматографии не существует. Более того, катехоламины и их производные, а также простые алифатические амины могут частично теряться из-за их разложения в щелочной среде. Как правило, биогенные амины определяют в отдельных участках головного мозга, в плазме или сыворотке крови и моче. Методика подготовки биологических проб к анализу одинаково зависит как от природы, так и от концентрации анализируемых соединений. Свободные основания и соли многих алифатических аминов и β -фенетиламинов хорошо растворимы в воде, и поэтому применять экстракцию с помощью не смешивающихся с водой органических растворителей не представляется возможным.

6.2.1. Биогенные амины животных тканей и биологических жидкостей

6.2.1.1. Алифатические амины и полиамины. Для экстракции аминов из животных тканей можно применять гомогенизацию с помощью кислотной обработки [0,1—0,4 М HClO_4 , 10%-ной трихлоруксусной кислотой, смесью ацетон/1 М HCl (95:5)]. Как указывалось выше, алифатические амины и β -фенетиламины нельзя экстрагировать органическими растворителями из их водных растворов, поскольку эти амины хорошо растворимы в воде. Провести концентрирование больших объемов кислотных растворов так, чтобы оно не сопровождалось потерей микрокомпонентов, очень сложно из-за летучести некоторых низкомолекулярных аминов. Концентрирование нейтрализованных растворов также, как выяснилось, сопровождается большими потерями. Решить эту проблему можно, используя ион-парную экстракцию [86]. Соединения аммония, первичные, вторичные и третичные амины образуют ионные пары с анионами. Ионные пары, экстрагируемые органическими растворителями, образуют 3,5-ди-*трет*-бутил-2-гидроксibenзолсульфонат [87], тетрафенилборат [88], антрацен-2-сульфонат [89] и диметоксиантрацен-2-сульфонат [90], а также ряд других соединений [91, 92].

Ароматические амины и некоторые β -фенилэтиламины можно экстрагировать из щелочных водных растворов органическими растворителями, а полиамины спермидин и спермин часто экстрагируют *n*-бутанолом перед хроматографическим разделением.

Важную роль играет предварительное разделение (фракционирование) биогенных аминов при помощи ионообменной хроматографии с последующим определением аминов в получаемых фракциях с использованием специфических методов. Этот

подход был применен при разработке наиболее автоматизированного способа анализа аминокислот, в основу которого положена ионообменная колоночная хроматография [95]. Успехи, достигнутые в разработке ионообменных смол в последние 20 лет, способствовали их использованию для разделения аминов, в том числе и для предварительного разделения. Широкое распространение получили карбоксиметилцеллюлоза [96], сульфированные полистиролы и другие типы катионообменных смол (дауэкс 50×8, амберлит CG-50 или CG-100 и биорекс 70) [97]. Амины элюируют растворами солей, концентрации которых и рН в процессе элюирования меняются, и при помощи специфических методов определяют содержание каждой из промежуточных фракций.

6.2.1.2. Катехоламины и другие ароматические амины. Выбор конкретного метода подготовки к хроматографическому разделению проб, содержащих катехоламины и серотонины, в большой степени зависит от селективности неподвижной фазы. Следует иметь в виду, что флуоресцентные методы обнаружения (тригидроксииндолный метод) [93] сами по себе не обладают достаточной специфичностью и позволяют осуществлять только групповое определение катехоламинов [94]. Однако если после аналогичной обработки пробы проводят ее разделение при помощи такого эффективного метода, как ВЭЖХ, то тот же флуоресцентный метод позволяет обнаруживать отдельные амины. Если используется неселективный метод обнаружения, то его возможности могут быть расширены путем обработки пробы с помощью селективного окисления [98]. Это, однако, неудобно, если применяется эффективная разделительная система.

Таким образом, основная задача предварительной обработки пробы перед проведением разделения методом ВЭЖХ состоит в отделении катехоламинов и их метаболитов от других компонентов пробы. Катехоламины и метанефрины можно отделить адсорбцией на катионообменниках в протонированной форме [97]. Включение стадии экстракции позволяет повысить селективность выделения, например, метанефринов [97]. Для отделения катехоламинов от биогенных аминов других типов можно провести селективную обратимую адсорбцию на активированном оксиде алюминия [99—101]. Осуществляют эту операцию следующим образом. После добавления небольшого количества (обычно 100 г и менее) промытого кислотой оксида алюминия рН элюата, полученного на предшествующей стадии ионообменного разделения, доводят до 8,6 (чаще всего добавляя 0,5 М трис-буфер). Поскольку образующийся устойчивый комплекс удерживается достаточно сильно, оксид алюминия можно промыть для того, чтобы удалить ненужные соединения. Промывку



Рис. 6.2. Очистка метаболитов тирозина.

M — метанефрин, NM — норметанефрин, 3-MT — 3-метокситирамин, DA — дофамин, EPI — эпинефрин, NE — норэпинефрин, MHPG — 3-метоксн-4-гидроксифенилгликоль, VMA — ванилминдальная кислота, HVA — гомованилиновая кислота, DOPAC — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота.

обычно проводят смесью, содержащей 100 мл дважды дистиллированной воды, 100 мкл 0,1 М раствора NaHCO_3 и 1 мл 0,5 М трис-буфера (рН 8,6). Катехоламины элюируют разбавленным водным раствором кислоты (0,1 м HClO_4 или 0,1 М HCl). Однако если адсорбент недостаточно хорошо активирован, возможны потери.

Способность катехинов образовывать подобный комплекс с борной кислотой положена в основу двух методов, с успехом используемых для их группового выделения. В первом из них катехины адсорбируются на геле, к полимерной или целлюлозной матрице которого привиты дигидроксисборильные группы [102—104]. В этом случае адсорбция, промывка и элюирование проводятся так же, как описано выше. Этот метод отличается от предыдущего большим выходом и лучшей воспроизводимостью. Во втором случае колонку промывают борной кислотой и удаляют катехины в виде комплексов [105]. В обоих случаях элюаты можно ввести в ЖХ-колонку.

Определение концентрации метаболитов моноаминов в тканях мозга может дать более надежные результаты, чем определение концентраций исходных моноаминов. Более того, *post mortem* метаболиты более стабильны, чем амины [106], и поэтому целесообразнее осуществлять анализ именно метаболитов.

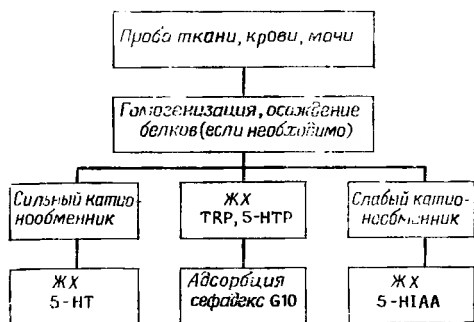


Рис. 6.3. Очистка метаболитов триптофана.

TRP — триптофан, 5-НТР — 5-гидрокситриптофан, 5-НТ — серотонин, 5-Н1АА — 5-гидроксииндол-3-уксусная кислота.

Перед разделением метаболитов катехоламинов, осуществляемым методом жидкостной колоночной хроматографии, обычно рекомендуется после осаждения белков провести экстракцию с целью группового выделения указанных соединений. Кислые метаболиты (3,4-дигидроксифенилуксусная, гомованилиновая, 5-гидроксииндол-3-уксусная кислоты) экстрагируются полярной органической фазой (этилацетат) при рН 2,0—4,0. Эффективность экстракции нейтрального метаболита 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля не зависит от значения рН в области 1,0—8,0. При рН 3,0 эффективность экстракции возрастает в ряду (средняя величина $\pm$ отклонение): 3-метокси-4-гидроксифенилгликоль (64 ± 3), 3,4-дигидроксифенилуксусная (84 ± 4), гомованилиновая (98 ± 4), 5-гидроксииндолуксусная (87 ± 3) кислоты. Проводить разделение кислотных и нейтральных компонентов часто необязательно, и экстракты можно непосредственно подавать на ЖХ-колодку.

Метаболиты катехина, как и метаболиты катехоламина, селективно адсорбируются на оксиде алюминия [99—101] или на геле борной кислоты [102—104]. Начинают обработку пробы с осаждения белков (если это необходимо), после чего осуществляют кислотную гомогенизацию, гидролиз сульфатных эфиров, экстракцию растворителями и в заключение проводят адсорбцию при рН 8,6. После промывки адсорбента начинают элюирование кислотным или метанольно-кислотным растворами. Селективность хроматографического анализа увеличивается в результате использования электрохимических методов обнаружения.

Подготовка к хроматографическому разделению проб, содержащих метаболиты триптофана (серотонин, 5-гидрокситриптофан, 5-гидроксииндол-3-уксусную кислоту) часто предусматривает более сложную обработку. Хорошие результаты дает очистка на маленьких экстракционных колонках [108]. Конкретный тип ионообменника определяется природой анализируемого соединения. Однако желательно, чтобы выбранный ионооб-

менник позволял проводить элюирование сразу нескольких соединений. Триптофан и 5-гидрокситриптофан выделяют на сильных катионообменниках, например на дауэксе AG-50, серотонин — на слабом катионообменнике, например на амберлите CG-50. 5-Гидроксииндолилуксусная кислота селективно адсорбируется на смолах, применяемых в гель-проникающей хроматографии (сефадекс G-10).

6.2.1.3. Предколоночное обогащение проб серотонином и 5-гидроксииндолил-3-уксусной кислотой. Жидко-твердофазные экстракционные колонки, используемые для предварительной очистки проб, не вполне отвечают требованиям жидкостной хроматографии. В жидкостную хроматографическую колонку обычно вводят всего примерно 10% того минимального объема растворителя, который необходим для элюирования интересующего исследователя соединения. Это означает, что примерно 90% количества выделенного соединения теряется. В то же время если нужно отделить серотонин и 5-гидроксииндолил-3-уксусную кислоту, содержащиеся в отдельных участках головного мозга крыс или в срезах тканей головного мозга, то необходим метод с чрезвычайно малым пределом обнаружения.

Одна из методов предварительного обогащения проб отдельных участков головного мозга крыс серотонином или 5-гидроксииндолилуксусной кислотой [109] и обогащения серотонином проб сыворотки и плазмы описана в работе [110]. Весь объем элюата из экстракционной колонки пропускают через маленькую предколону, заполненную фазой C_{18} , что приводит к повышению концентрации исследуемых соединений. Далее через эту колонку пропускают в обратном направлении ток подвижной фазы и переводят таким образом исследуемое соединение в аналитическую колонку. В итоге концентрация серотонина и 5-гидроксииндолилуксусной кислоты повышается примерно в 100 раз, что позволяет проводить определение этих соединений в малых участках головного мозга. Преимущество такого подхода демонстрируется на конкретных примерах в ряде работ [111—113].

6.3. Колоночная жидкостная хроматография биогенных аминов

6.3.1. Ионообменная хроматография

6.3.1.1. Алифатические амины, β -фенилэтиламины, ди- и полиамины. Метод ионного обмена используется для разделения биогенных аминов уже достаточно давно. Еще в 1958 г. были разработаны устройства для автоматического анализа амина-

кислот [95]. Многие исследователи [114—120] успешно осуществляли разделение различных аминов на колонках, заполненных сульфированными полистирольными смолами, элюируя амины при программируемом изменении pH или концентрации солей. Как и ароматические аминокислоты, ароматические амины довольно интенсивно взаимодействуют с полимерной матрицей. Поэтому порядок элюирования аминов не вполне соответствует предполагаемому исходя из ион-конкурентного равновесия.

Выбранные авторами перечисленных выше работ катионообменные смолы позволили осуществить полное разделение смесей биогенных аминов. Объединяя ионообменную хроматографию с другими селективными методами разделения (бумажной хроматографией, электрофорезом на бумаге), можно определять алифатические амины и фенилэтиламины в тканях мозга, моче и спинномозговой жидкости [114, 115, 121—125]. Дальнейшее развитие этого направления привело к разработке методики, предусматривающей в качестве основной стадии подготовки проб их обработку на небольших ионообменных колонках с последующим разделением методом ВЭЖХ.

В некоторых случаях этот же метод применялся для разделения ди- и полиаминов. Как правило, обычные аминокислотные анализаторы в принципе пригодны для разделения полиаминов, причем обнаружение их осуществляют при помощи нингидринового метода [126—129]. Как и аминокислоты, полиамины элюируют при программируемом изменении pH и концентрации элюента. При помощи флуорескамина (4-фенилспирофурано-2(3Н),1'-фталан-3,3'-диона) [130, 130а] можно обнаружить пикомоли аминокислот [131] и аминов [132—134]. Еще одно преимущество флуорескамина — большая скорость взаимодействия с аминами даже при комнатной температуре (миллисекунды). Избыток флуорескамина можно гидролизовать до нефлуоресцирующих продуктов. Смешивая элюат с 2 М боратым буфером (pH 9,0), получают оптимальное значение pH для реакции с флуорескамином, в то же время борная кислота предохраняет некоторые катехоламины от окислительного расщепления [134].

Кроме флуорескамина можно использовать фталевый диальдегид [153], образующий в присутствии 2-меркаптоэтанола сильно флуоресцирующий продукт. Если разделение путресцина и спермидина проводится на современных ионообменных смолах и в качестве обнаруживающего реагента применяется фталевый альдегид, предел обнаружения при проведении рутинных анализов составляет 12—15 пмоль.

6.3.1.2. Катехол- и индоламины и их метаболиты. Разработка микрогранулированных химически модифицированных ионообменных материалов на основе стекла и диоксида кремния

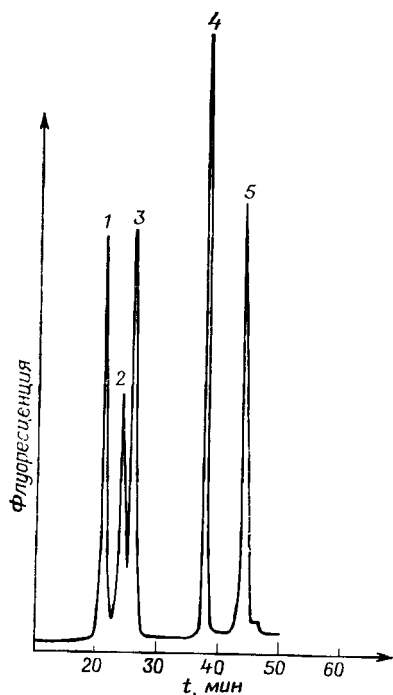


Рис. 6.4. Разделение стандартной смеси путресцина (1), гистаминна (2), кадаверина (3), спермидина (4) и спермина (5) (1 нмоль каждого).

Колонка: дуррум DC 6A 50×4 мм; элюент: цитрат натрия, 29,4 г/л, pH 5,2; градиентное элюирование; добавление различных количеств K/NaCl; объемная скорость: 51 мл/ч; температура: 67 °C; обнаружение: по флуоресценции, 355 (возбуждение) и 418 нм (испускание); последующая обработка фталевым альдегидом/меркаптоэтанолом.

сыграла важную роль в развитии хроматографических методов анализа биогенных аминов. На колонках с катионообменниками можно проводить разделение исходных катехоламинов, проявляющих основные свойства. Соответственно для метаболитов катехоламинов с кислотными свойствами и их сульфопроизводных с успехом применяются анионообменники. Хотя и катионо- и анионообменники вполне пригодны для разделения соответственно основных аминов и их кислых метаболитов, если анализируемая смесь содержит одновременно и катехоламины, и их карбоксильные метаболиты, разделение осуществляется недостаточно эффективно. Ни один из вариантов методики не дает вполне удовлетворительных результатов.

Влияние ионной силы и pH элюента на время удерживания некоторых катехоламинов на колонке с катионообменником, иллюстрирует табл. 6.3.

Необходимо отметить, что при разделении органических соединений ионообменная хроматография представляет собой особый вид обращенно-фазовой хроматографии, предусматривающей как электростатическое, так и гидрофобные взаимодействия. Очень высокая селективность разделения наблюдается

Таблица 6.2. Примеры разделения норадrenalина и адреналина при помощи ВЭЖХ на ионообменниках

Неподвижная фаза	Размеры колонки, мм ²	Элюент	Объемная скорость, мл/мин	Литература
Зипакс SCX	2,1×1,0	0,1 М CH ₃ COONa в 0,02 М HCl (pH 6,3)	1,0	136
	2,1×1,0	0,05 М CH ₃ COONa в 0,01 М HCl	1,4	136
	2,1×1,0	0,075 М NaH ₂ PO ₄	0,5	136
	2,1×1,0	0,15 М NaH ₂ PO ₄	0,4	136
	2,1×1,0	0,05—0,45 М NaH ₂ PO ₄	0,4	136
	2,0×0,5	0,1 М HClO ₄	0,3	137
Дю понт SCX	3,0×1,2	0,1—1 М (NH ₄) ₃ PO ₄ (pH 7,0)	1,0	138
Видак (катионо-обменник)	2,0×0,5	0,01 М H ₂ SO ₄ —0,04 М Na ₂ SO ₄	0,4	136
Партисил-10 SCX	4,6×0,25	0,5 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 4,36)	0,76	136

^a Внутренний диаметр.

при использовании ион-парной хроматографии [140, 141] или динамических катионообменных хроматографических систем [59, 142—150].

6.3.2. Обращенно-фазовая распределительная хроматография

6.3.2.1. Алифатические амины, β-фенилэтиламины, ди- и полиамины. Значительные успехи в области разделения биологических объектов стали возможны благодаря появлению химически модифицированных неподвижных фаз. Наибольшая селективность и эффективность были достигнуты при разделе-

Таблица 6.3. Влияние ионной силы и pH на время удерживания катехоламинов [137]^a

Концентрация буфера-элюента, М	pH	Время удерживания, мин		
		Норадrenalин	Адреналин	Дофамин
0,2	5,1	5,6	10,0	18,5
0,1	5,1	5,6	10,2	18,6
0,05	5,1	8,0	13,4	23,4
0,2	4,4	3,9	6,4	11,5
0,075	3,65	3,2	4,8	8,4

^a Условия хроматографического разделения: колонка 500×2,1 мм; смола хитачи 3011 с, температура колонки 30 °С, объемная скорость 1,5 мл/мин.

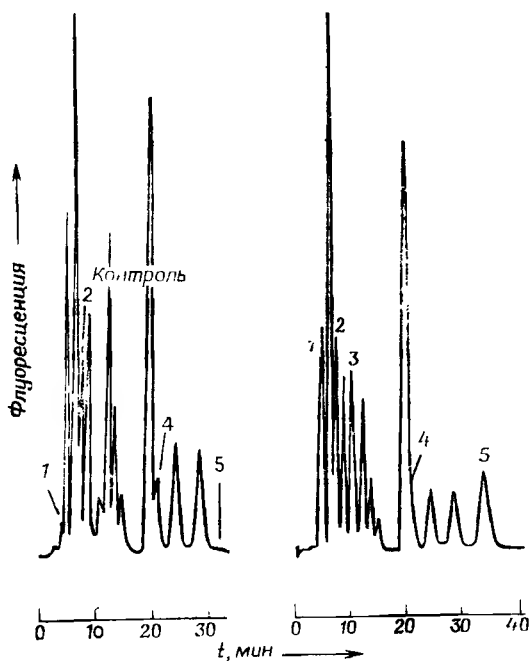


Рис. 6.5. Разделение обращенно-фазовой ВЭЖХ биогенных аминов плазмы крови в виде производных фталевого альдегида [153].

Образец: 5 мкл (эквивалентно 0,05 мл плазмы крови); колонка: μ -бондапак 300X $\times$ 4 мм; элюент: 0,05 М NaH_2PO_4 (pH 5,10) с 480 мл/л метанола; объемная скорость: 1,5 мл/мин; температура: 35 °С.

1 — 5-гидроксининдол; 2 — иорэpineфрин; 3 — дофамин; 4 — тирамин; 5 — иормета-нефрин.

нии на неподвижных фазах типа щеток — силикагелевых носителях с привитыми C_8 - или C_{18} -группами. Очевидно, что этот метод целесообразно использовать и для разделения биогенных аминов. Однако хроматографирование алифатических аминов, диаминов и полиаминов на указанных фазах затруднено из-за их полярности, а также отсутствия подходящего хромофора, что чрезвычайно усложняет обнаружение.

Модифицирование биогенных аминов флуорофорами позволяет получать липофильные молекулы, для обнаружения даже очень малых концентраций которых пригодны детекторы по флуоресценции. Модифицирование аминов можно проводить дансилхлоридом [151], флуорескаминем [96] или фталевым диальдегидом [153] (в последнем случае в присутствии 2-меркаптоэтанола). Проводя разделение указанных производных аминов методом обращенно-фазовой хроматографии, можно обнаруживать нано- и даже пикограммовые количества аминов, причем гораздо быстрее, чем при использовании ионообменной хроматографии. Правда, не следует забывать, что данная методика включает дополнительную стадию — стадию получения производных.

Необходимо также отметить, что флуорескамин и фталевый диальдегид реагируют только с первичными аминами, а дансилхлорид — как с первичными, так и с вторичными.

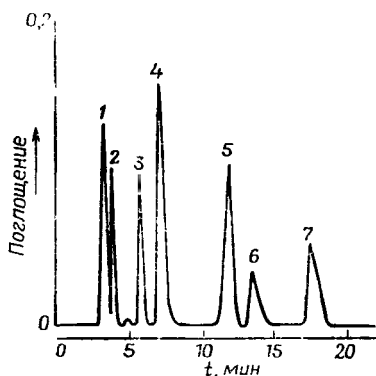


Рис. 6.6. Хроматограмма 3-О-метилованных метаболитов дофамина.

Колонка: партисил 1025 ODS; элюент: 50 мМ KH_2PO_4 (рН 4,6); объемная скорость: 0,66 мл/мин; температура: 25 °С (аналогично [143]).

1 — 3-метокси-4-гидроксиминдальная кислота; 2 — норметанефрин; 3 — метанефрин; 4 — 3-метокситирамин; 5 — 3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота; 6 — паранефрин; 7 — 3-метокси-4-гидроксифенэтанол.

6.3.2.2. Катехол- и индоламины и их метаболиты. Метаболиты катехол- и индоламина в отличие от исходных соединений обладают кислотными свойствами. Анионо- или катионообменная хроматография может быть использована для разделения производных катехина с соответственно только кислотными или основными свойствами, тогда как обращенно-фазовая распределительная хроматография позволяет разделять соединения обоих классов в течение одного анализа. В обычной обращенно-фазовой хроматографии доминируют гидрофобные взаимодействия между растворенными молекулами и алифатическими группами, химически привитыми к поверхности носителя, а для ион-парной (динамический ионный обмен) методики характерно одновременное электростатическое и гидрофобное взаимодействие.

Обращенно-фазовая хроматография. Для разделения производных катехина на неполярной неподвижной фазе в качестве элюента следует выбирать буферные растворы на основе фосфорной [143], азотной, трихлоруксусной и уксусной кислот [148, 154]. На время удерживания влияет наличие в элюенте (и концентрация) органических добавок (ацетонитрила, метанола, пропанола), а также рН элюента. С увеличением рН уменьшается время удерживания кислотных компонентов и увеличивается время удерживания соединений, обладающих основными свойствами, но при высоких рН катехоламин (основание) легко окисляется [155], а стабильность работы колонки в щелочной среде уменьшается. Уменьшение времени удерживания с увеличением степени диссоциации ионогенных групп разделяемых соединений указывает на доминирующую роль гидрофобных взаимодействий и пренебрежимо малое значение электростатических взаимодействий при разделении методом обращенно-фазовой хроматографии. Влияние рН элюента на удерживание катехоламинов иллюстрирует рис. 6.7.

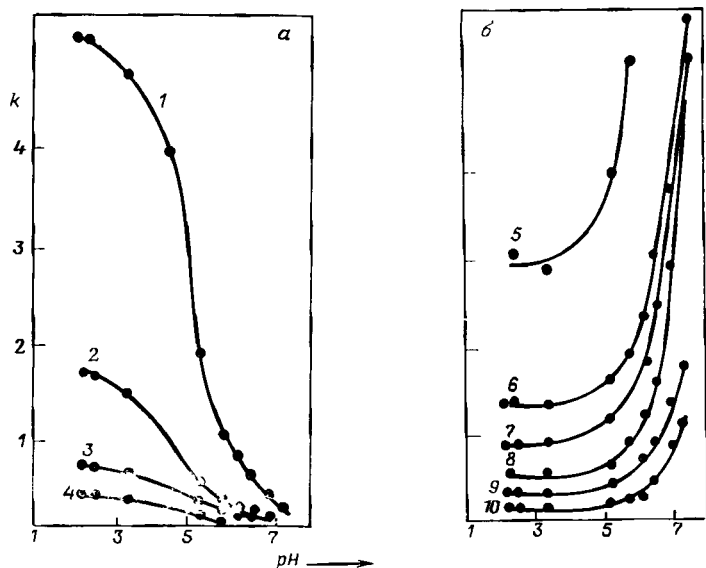


Рис. 6.7. Влияние pH на время удерживания кислотных метаболитов катехоламинов (а) и исходных катехоламинов (б) (аналогично [143]).

Колонка: партисил 1025 ODS; элюент: 0,1 М фосфатный буфер; объемная скорость: 1 мл/мин; температура 25 °С (аналогично [143]).

1 — гомованилиновая кислота; 2 — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 3 — ванилилминдальная кислота; 4 — 3,4-дигидроксиминдальная кислота; 5 — паранефрин; 6 — 3-О-метилдофамин; 7 — метанефрин; 8 — тирамин; 9 — эpineфрин; 10 — норэpineфрин.

Разделение соединений с основными свойствами в обращенно-фазовых системах провести сложно, если система характеризуется низкой селективностью и пики имеют длинные хвосты [144, 148], по-видимому, из-за сильного взаимодействия сильно полярных групп разделяемых соединений с несиланизированными центрами на поверхности носителя. Добавление в элюент натриевых солей неорганических кислот, например 0,05—0,2 М перхлората натрия, может значительно уменьшить асимметричность пиков и повысить эффективность разделения [148]. Кроме того, перхлорат натрия влияет на время удерживания кислотных или основных компонентов.

Следует, однако, отметить, что ни добавление перхлората натрия, ни варьирование величины pH и содержания пропанола не позволяют добиться полного разделения исходных веществ с основными свойствами и их кислотных метаболитов. Обычные обращенно-фазовые хроматографические системы наиболее пригодны для разделения метаболитов с кислотными свойствами и менее приемлемы для разделения органических оснований.

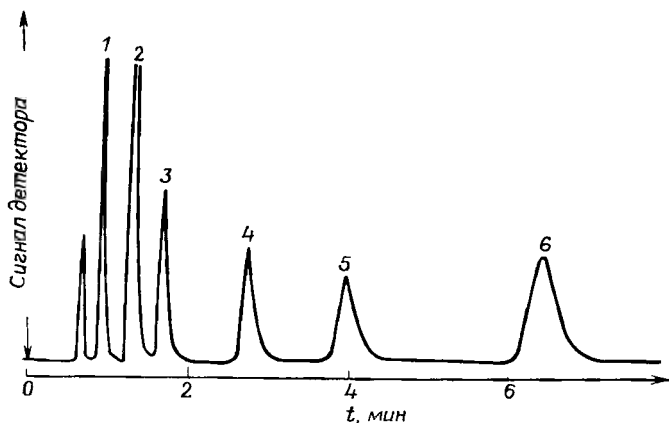


Рис. 6.8. Экспресс-разделение стандартной смеси кислотных метаболитов катехоламина методом обращенно-фазовой хроматографии.

Колонка: C_8 -привитый силикагель, 250 мм; элюент: 0,02 М цитрат лития (рН 2,50) + +3 об. % *n*-пропанола + 0,2 М NaClO₄; температура: 25 °С (аналогично [148]).
 1 — 3,4-дигидроксиминдальная кислота; 2 — ванилилминдальная кислота; 3 — 2,5-дигидроксифеилуксусная кислота; 4 — 3,4-дигидроксифеилуксусная кислота; 5 — 5-гидроксининдол-3-уксусная кислота; 6 — гомованилиновая кислота.

Разделение при помощи динамического катионообмена (детергентная хроматография). Эта методика предусматривает использование неподвижной фазы для обращенно-фазовой хроматографии в сочетании с гидрофильным элюентом, содержащим органический модификатор и небольшое (0,1% или менее) количество поверхностно-активного вещества (ПАВ).

ПАВ, например 1-додецил- или лаурилсульфат натрия, или додецилбензолсульфонат натрия, адсорбируются на гидрофобной поверхности неподвижной фазы, образуя анионный слой, вследствие чего она приобретает свойства ионообменника. Получаемая таким образом динамическая катионообменная система, как выяснилось, пригодна для разделения аминокислот [147] и катехоламинов [58, 144]. Разделение метаболитов катехоламина, обладающих кислотными свойствами, происходит главным образом по механизму распределительной хроматографии [155]. Влияние на время удерживания и эффективность разделения катехоламина и его метаболитов добавления в элюент додецилсульфата натрия иллюстрирует рис. 6.9. На скорость разделения, его селективность и разрешение существенное влияние оказывают концентрация додецилсульфат-анионов и катионов натрия (противоионы), природа и концентрация органического модификатора (или кислоты), наличие солей. Динамические катионообменные системы такого типа в принципе подобны обычным ионообменным системам, поэтому влияние различных факторов на время удерживания предска-

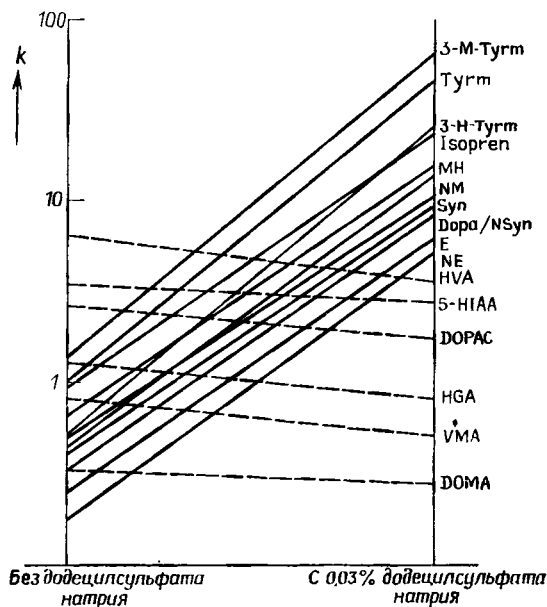


Рис. 6.9. Влияние добавок додецилсульфата натрия на коэффициент емкости катехоламинов и их производных.

Колонка: Са-привитый силикохром; элюент: а — 0,02 М лимонная кислота (рН 2,50) + 3 об. % *n*-пропанола + 0,2 М NaClO₄; температура: 25 °С, б — 0,02 М лимонная кислота (рН 2,50) + 3 об. % *n*-пропанола + 0,125 М NaClO₄ + додецилсульфат натрия (0,03%); температура: 25 °С (аналогично [148]). 3-M-Tyrm — 3-метокситирамин; Tyrm — тирамин; 3-H-Tyrm — дофамин; Isopren — изопрен; MH — метанефрин; NM — норметанефрин; Syn — синефрин; Dopa — 3,4-дигидроксифенилаланин; NSyn — норсинефрин; E — эпинефрин; NE — норэпинефрин; HVA — гомованилиновая кислота; 5-HIAA — 5-гидроксинндолил-3-уксусная кислота; DOPAC — 3,4-дигидроксифенил-уксусная кислота; HGA — 2,5-дигидроксифенил-уксусная кислота; VMA — ванилильминдальная кислота; DOMA — дигидроксиминдальная кислота.

зять можно. Увеличение концентрации противоионов (Na⁺) или ПАВ приводит к увеличению коэффициента емкости k для соединений с основными свойствами. Зависимость величины k от концентрации ПАВ в системе с анионогенным ПАВ имеет такой же характер, что и в анионообменной системе с катионогенным ПАВ (например, при разделении сульфоновых кислот в присутствии цетилтриметиламмонийбромид [157]).

Эффективность разделения более всего повышают ацетонитрил и метанол, тогда как *n*-пропанол способствует стабильности работы колонки [148].

Увеличение концентрации кислоты в элюенте снижает время удерживания и несколько увеличивает число теоретических тарелок, а добавление органического модификатора повышает скорость разделения, однако одновременно вызывает некоторое уменьшение числа теоретических тарелок. К сожалению, из-за

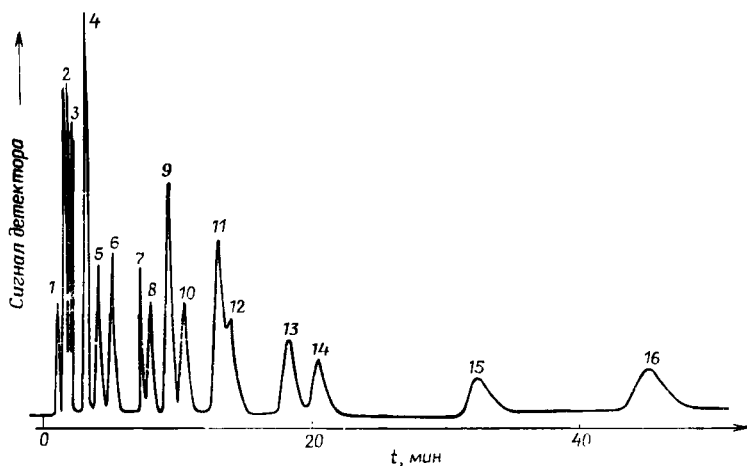


Рис. 6.10. Разделение стандартной смеси катехоламинов и их метаболитов в изократических условиях в динамической катионообменной системе.

Колонок: C_8 -привитый силихром; элюент: 0,02 М лимонная кислота (pH 2,50) + 1 об. % *n*-пропанола + 0,2 М $NaClO_4$ + 0,3% додецилсульфата натрия; температура: 25°C (аналогично [48]).

1 — 3,4-дигидроксиминдальная кислота; 2 — ванилиминдальная кислота; 3 — 2,5-дигидроксифенилуксусная кислота; 4 — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 5 — 5-гидроксинидол-3-уксусная кислота; 6 — гомованилиновая кислота; 7 — адреналин; 8 — норадреналин; 9 — норэпинефрин; 10 — синеприн; 11 — 3,4-дигидроксифенилаланин; 12 — норметанефрин; 13 — метанефрин; 14 — дофамин; 15 — тирамин; 16 — 3-метокситирамин.

недостаточной стабильности неподвижной фазы повышать концентрацию кислоты можно лишь до определенного предела (не более 10^{-2} М) и соответственно рекомендуется избегать слишком длительного элюирования.

После оптимизации хроматографических условий разделение смесей основных катехоламинов и их кислотных производных можно осуществить достаточно быстро. Рис. 6.10 показывает, что катехоламины элюируются в порядке, примерно обратном наблюдаемому для ион-парных или обращенно-фазовых систем. Добавление в элюент додецилсульфата натрия оказывает положительное влияние на разделение соединений с основными свойствами и слабо влияет на разделение кислотных компонентов. Разделение последних лучше проводить в обращенно-фазовых системах без добавления ПАВ. Следовательно, в каждом конкретном случае необходимо искать некое компромиссное решение, удовлетворяющее условиям эффективного разделения метаболитов с кислотными свойствами (чему способствует уменьшение концентрации органического модификатора или додецилсульфата натрия в элюенте) и катехоламинов, обладающих основными свойствами (этому способствует повышение концентрации додецилсульфата натрия).

Уменьшить концентрацию додецилсульфата натрия можно путем введения его в неподвижную фазу и одновременного исключения из состава подвижной фазы [148]. Это приводит к значительному увеличению времени удерживания соединений с основными свойствами и не влияет на время удерживания кислотных метаболитов; такой прием также увеличивает время жизни колонки.

6.4. Принципы обнаружения

6.4.1. Измерение природной флуоресценции

Катехины и индолы, как известно, обладают способностью к флуоресценции [77, 187] или же под действием различных окислительных реагентов легко образуют флуоресцирующие тригидроксииндолные производные.

Хроматографические системы, в которых к ВЭЖХ-колонкам непосредственно подсоединены флуориметрические детекторы, характеризуются высокой селективностью, и их пределы обнаружения сравнимы с получаемыми в системах ВЭЖХ-колонка/электрохимический детектор.

Обнаружение катехинов [78, 81, 189—193] и индолов [198—196] по природной флуоресценции стало возможным с появлением спектрофлуориметрических детекторов для ВЭЖХ. Интерес к детекторам по флуоресценции увеличился после того, как выяснилось, что электрохимические детекторы недостаточно практичны и имеют нестабильные эксплуатационные характеристики.

Флуориметрическое обнаружение позволяет повысить селективность аналитической системы. Помимо того что относительно немногие соединения обладают природной флуоресценцией, они еще и различаются по спектрам возбуждения и испускания. Максимумы возбуждения катехоламинов соответствуют 200—220 и 280—380 нм, максимумы испускания 310—330 нм, тогда как максимумы возбуждения индолов соответствуют 210—220 и 270—280 нм, а максимумы испускания 360 нм. Спектры возбуждения и испускания производных катехинов и индолов также различаются, сдвиг максимумов в них обусловлен батохромным эффектом. Предел обнаружения немодифицированных индолов и катехинов составляет соответственно 5—25 и 100—500 пг. Согласно данным работы [188], предел обнаружения тригидроксииндолных производных норадrenalина и адренолина составляет 1 пг, что говорит о возможных резервах увеличения чувствительности метода. Когда осуществляют возбуждение при 280 нм, а испускание происходит при 310—315 нм, наблюдается значительное уменьшение индольного пика, а интенсивность испускания катехоламина меняется слабо, что

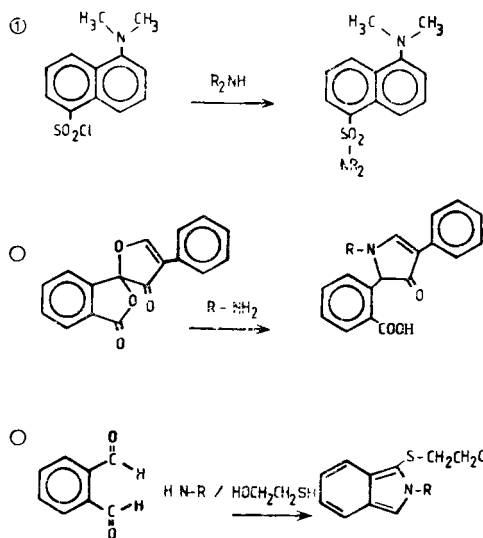


Рис. 6.11. Образование флуоресцирующих производных динитрофторбензола (1), флуорескаммина (2) и фталового диальдегида (3).

позволяет дополнительно увеличить селективность обнаружения катехоламинов в присутствии индолов [81]. Возбуждение при 200 нм облегчает обнаружение катехоламинов и серотонина, при этом предел обнаружения других индолов значительно снижается, а также существенно уменьшается селективность обнаружения катехоламинов относительно индолов.

6.4.2. Окрашенные и флуоресцентные производные

Обнаружение биогенных аминов, содержащих первичные и вторичные аминогруппы, в виде окрашенных производных применяется в ограниченных пределах главным образом из-за недостаточно высокой чувствительности метода (предел обнаружения соответствует наномолю). В качестве реагентов, предназначенных для получения окрашенных производных, широкое распространение получили только 2,4-динитрофторбензол (реагент Сэнгера [158, 159]) и 2,4-динитробензолсульфоновая кислота [160]. Оба этих реагента дают производные одинакового состава. После того как были разработаны методы синтеза флуоресцирующих производных, отпала необходимость в получении окрашенных производных.

Для получения флуоресцирующих производных может быть рекомендован широкий круг реагентов [176]. Таковыми являются сульфохлориды: 5-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (ДНС-Cl), 5-ди-*n*-бутиламинонафталин-1-сульфохлорид [158, 159], 6-метиланилинонафталин-2-сульфохлорид [160] и 2-*n*-хлорсульфобензил-3-фенилиндан [161, 162], изотиоцианаты: 4-диметиламинонафталин-1-изотиоцианат [163], флуоресцеинизотио-

цианат [164] и 9-изотиоцианатакридин [165], альдегиды: фталевый альдегид и пиридоксаль [166, 167], 4-фенилспирофур-ан-2(3Н),1'-фталан-3,3'-дион (флуорескамин).

Из числа приведенных выше реагентов в колоночной жидкостной хроматографии широко применяются только ДНС-С1 [168—172], флуорескамин [133] и фталевый альдегид [173—175]. Получение окрашенных производных может проводиться как до, так и после хроматографического разделения [176]. Реакцию с ДНС-С1 лучше проводить до разделения, тогда как флуорескамин и фталевый альдегид широко используют как для предколоночной, так и послеколоночной обработки исследуемых соединений.

ДНС-С1 реагирует с первичными и вторичными аминогруппами, а также с фенолами и имидазолами с образованием сильнофлуоресцирующих производных [177—180]. Этот реагент нашел применение во многих лабораториях преимущественно для идентификации ди- и полиаминов [170, 171, 181]. Амины указанного типа очень хорошо растворимы в воде, и их разделение рекомендуется проводить только при помощи ионообменной хроматографии, которая требует достаточно больших затрат времени. К современной ВЭЖХ можно прибегать после введения в молекулы исследуемых аминов хромофоров или флуорофоров с тем, чтобы облегчить обнаружение аминов [182] и одновременно повысить их липофильность. Флуорескамин и фталевый альдегид реагируют с первичными аминами с большой скоростью, что позволяет использовать эти реагенты не только для предколоночной, но и послеколоночной обработки аминов. Замена нингидрина на флуорескамин в аминокислотных анализаторах (1973 г.) повысила чувствительность анализа в 100 раз [132]. Методики анализа, включающие стадии предварительного получения производных и последующего их разделения при помощи ВЭЖХ, превосходят методики, основанные на ионообменном разделении, как по селективности, так и по скорости анализа. Более того, предколоночная обработка повышает стабильность соединений и облегчает их экстракцию. Однако предколоночное получение производных исследуемых соединений проводится все же главным образом потому, что предел обнаружения разделяемых методом ВЭЖХ производных фталевого альдегида [153, 183, 184], флуорескамина [134, 185, 186] и других реагентов, образующих флуоресцирующие соединения, можно снизить до пикограммового уровня.

6.4.3. Электрохимическое обнаружение

Поскольку в современных ионообменных и обращенно-фазовых системах допустимо использование водных элюентов, обнаружение аминов можно проводить электрохимическими методами.

При помощи электрохимических детекторов осуществляют обнаружение в основном катехоламинов, а также некоторых индолов.

Об анодном окислении фенолов и индолов стало известно по крайней мере 50 лет назад, однако эта реакция не привлекала особого внимания исследователей, поскольку все катехины реагируют в данном случае одинаково и различить их не представляется возможным. Очевидно, что только путем объединения электрохимического окисления соединений и последующего их хроматографического разделения можно достичь успеха. Положительную роль в данном случае играет и тот факт, что в современных хроматографических системах в состав подвижных фаз вводят растворители, полностью диссоциирующие на ионы и характеризующиеся высокой проводимостью. В процессе анодного окисления катехоламинов (на графитовом или стеклоуглеродном электроде) образуются *o*-хинон, два протона и два электрона (рис. 6.12).

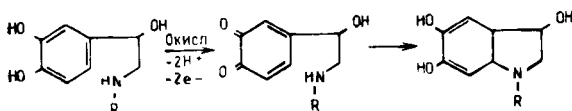


Рис. 6.12. Двухэлектронное окисление катехоламинов и последующее образование дигидроиндолов при контролируемом рН.

Предельный ток для окисления дофамина достигается при значении потенциала 0,60 В, для норметанефрина — при 0,80 В. Вольтамперограмма гомованилиновой кислоты имеет максимум при 0,60 В. Для индолов характерна двойная схема окисления, поскольку происходят N-окисление, а также окисление фенольной группы 5-гидроксисоединений [197]. Представитель этого класса соединений — 5-гидрокситриптамин (серотонин), на его вольтамперограмме при 0,60 В наблюдается плато, а дальнейшее увеличение потенциала приводит к усилению тока (рис. 6.13). При окислении аминов, не содержащих фенольной группы, например триптамина, предельный ток не наблюдается до 1,10 В. Почти селективное обнаружение 5-гидроксисоединений можно осуществить при 0,60 В, поскольку анодное окисление 5-гидроксигрупп начинается при более низком потенциале, чем N-окисление.

Увеличение чувствительности аналитической системы до предела, позволяющего обнаружить соединение, концентрация которого составляет $10^{-9}\%$ (или менее), удовлетворяющего требованиям анализа эндо- и экзогенных веществ в биологических пробах, осложнено по ряду причин: в указанных условиях трудно добиться необходимой воспроизводимости, трудно скон-

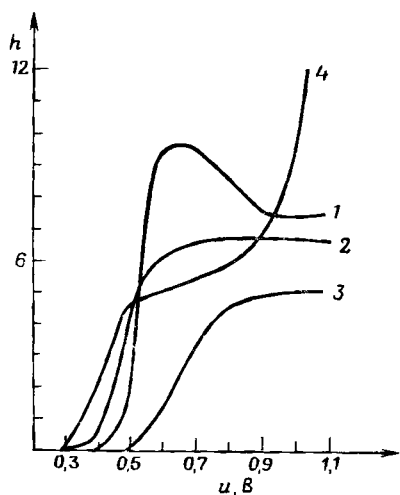


Рис. 6.13. Вольтамперограмма гомованилиновой кислоты (1), дофамина (2), норметанефрина (3) и серотонина (4).

струировать такую установку, которая была бы достаточно практична и работать с которой было бы достаточно просто. Такие же проблемы возникают и при осуществлении электрохимического обнаружения. Несмотря на тщательную дегазацию элюентов и заземление, в системе нередко появляются шумы и нарушается стабильность сигнала, что препятствует использованию электрохимических детекторов для рутинных анализов.

Электрохимические процессы осуществляются на поверхности раздела фаз (на поверхности электрода), поэтому детекторы этого типа очень чувствительны даже к небольшим изменениям состава элюента. Именно по этой причине на хроматограммах, получаемых при электрохимических методах обнаружения, наблюдается большой начальный пик, соответствующий фронту растворителя; если же в системе используется детектор по флуоресценции, такой пик отсутствует.

6.5. Применение

Объединение методов эффективного хроматографического разделения и высокочувствительного флуоресцентного или амперометрического обнаружения (на уровне пикограммовых количеств) впервые позволило решить задачу одновременного определения содержания влияющих на нервную деятельность биогенных аминов и их метаболитов в локальных участках головного мозга, в крови или животных тканях. В табл. 6.4 приведены некоторые конкретные примеры практического при-

Таблица 6.4. Некоторые примеры применения ВЭЖХ в сочетании с амперометрическими и флуоресцентными методами обнаружения в нейрохимических исследованиях

Соединение	Проба	Метод ^а		Литература
		раздс-ления	обнару-жения	
Серотонин	Кровь, плазма, сыворотка	ОФ	ЭХ	110
Норэпинефрин, дофамин	Кровь, плазма, сыворотка	ИО	ЭХ	198
Дофамин, норэпинефрин, 5-Гидрокситриптофан, серотонин, 5-Гидроксиндолил-3-уксусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	199
Дофамин, метаболиты	Среда инкубирования	ОФ	Ф	192
Норэпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ОФ	ЭХ	200
	Гомогенат ткани	ИО	ЭХ	201
	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	202
Норэпинефрин, дофамин, ДОФА, 3,4-дигидрокси-фенилуксусная кислота, норэпинефрин, эпинефрин, дофамин	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	79
Дофамин, норэпинефрин, эпинефрин	Моча	ОФ	ЭХ	103
Норэпинефрин, эпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ИО	Ф	188
	Моча	ОФ	Ф	191
Дофамин, норэпинефрин, эпинефрин	Гомогенат ткани	ИО	ЭХ	203
Эпинефрин	Гомогенат ткани	ИО	ЭХ	204
Норэпинефрин, эпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ОФ	ЭХ	205
Норэпинефрин, дофамин, серотонин, тирамин	Кровь, моча, гомогенат ткани, моча	ОФ	Ф	153
Норэпинефрин, дофамин, 4-гидроксифенилуксусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	206
Норэпинефрин, дофамин, серотонин	Гомогенат ткани	ИО	ЭХ	207
Норэпинефрин, эпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ИО	ЭХ	208
	Кровь, плазма, сыворотка	ИО	ЭХ	209
Норэпинефрин, эпинефрин, ДОФА, дофамин, 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	59
ДОФА, метаболиты	Гомогенат ткани, кровь, плазма, сыворотка	ОФ	ЭХ	210

Соединение	Проба	Метод ^а		Литература
		разде- ления	обнару- жения	
Норэпинефрин, эpineф- рин, дофамин	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	211
Ди- и полиамины	Гомогенат ткани, кровь, плазма, сыворотка,	ИО	Ф	152
Полнамины	Гомогенат ткани	Ад	Ф	171
Серотонин, 5-гидроксн- индолил-3-уксусная кислота, 5-гидроксн- триптофан, гомовани- линовая кислота, 3,4- дигидроксифенилук- сусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	74
Серотонин, 5-гидроксн- индолил-3-уксусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	109
Ванилилминдальная кис- лота, эpineфрин, нор- эpineфрин, дофамин, метаболиты	Моча	ОФ	УФ	144
Серотонин, 5-гидроксн- индолил-3-уксусная кислота, триптофан	Гомогенат ткани, кровь, плазма, сыворотка, мо- ча	ОФ	ЭХ	108
Серотонин	Кровь, плазма, сыворот- ка	ОФ	ЭХ	110
Ванилилминдальная и гомованилиновая кис- лоты	Моча	ОФ	ЭХ	212
3,4-Дигидроксифенилук- сусная кислота, гомо- ванилиновая кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	69
Гомованилиновая кисло- та	Моча	ОФ	ЭХ	213
5-Гидроксиндолил-3-ук- сусная кислота, трип- тофан, индолуксусная кислота		ОФ	Ф	214, 215
Гомованилиновая кисло- та, тирозин, 5-гидро- ксиндолил-3-уксусная кислота		ОФ	Ф, ЭХ	216
Серотонин, 5-гидроксн- индолил-3-уксусная кислота	Гомогенат ткани	ОФ	ЭХ	217
3-Метокси-4-гидроксн- фенилглюколь		ОФ	ЭХ	218
Эpineфрин, норэpineф- рин, норметанефрин, дофамин, серотонин	Кровь, плазма, сыворот- ка	ОФ	Ф	62

Продолжение

Соединение	Проба	Метод ^а		Литера- тура
		разде- ления	обнаруже- ния	
Эпинефрин, норэпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ОФ	Ф	220
5-Гидрокситриптофан	Кровь, плазма, сыворотка	ОФ	Ф	215
5-Гидроксиндолил-3-уксусная и индолилуксусная кислоты	Моча	ОФ	Ф	61
Норэпинефрин, эпинефрин	Кровь, плазма, сыворотка	ИО	ЭХ	75
5-Серотонин, норэпинефрин, дофамин	Гомогенат ткани	ОФ	Ф	190
Эпинефрин, норэпинефрин, ДОФА, дофамин, серотонин, тирамин, триптофан	Гомогенат ткани	ОФ	Ф	196

^а Методы хроматографического разделения: ОФ — обращенно-фазовый, ИО — ионообменный, Ад — адсорбционный. Методы обнаружения: ЭХ — электрохимический, Ф — флуоресцентный.

менения ВЭЖХ для анализа биогенных аминов в биологических объектах (естественно, что этот список нельзя считать полным).

Литература

1. Bachrach U. Function of Naturally Occuring Polyamines. Academic Press, New York, 1973.
2. Jänne J., Pöso H., Raina A. Biochim. Biophys. Acta, **473**, 241 (1978).
3. Maudsley D. V. Biochem. Pharmacol., **28**, 153 (1979).
4. Desser H., Niebauer G. W., Gebhart W. Zbl. Vet. Med., **A 27**, 45 (1980).
5. Bachrach U. Ital. J. Biochem., **25**, 77 (1976).
6. Campbell R. A., Morris D. R., Sartos D., Daves G. D., Bartos F. Advances in Polyamine Research, vol. 2, Raven Press, New York, 1978.
7. Russell D. H., Durie B. G. M. Polyamines as Biochemical Markers of Normal and Malignant Growth, Raven Press, New York, 1978.
8. Desser H. Polyamines in Biomedical Research, J. Wiley and Sons, London, 1981.
9. Russell D. H., Levy C. C., Schimpff S. C., Hawk I. A. Cancer Res., **31**, 1555 (1971).
10. Russell D. H., Durie B. G. M., Salmon S. E. Lancet II, 797 (1975).
11. Guggenheim M. Die biogenen Amine. Verlag von S. Karger, Basel — New York, 1961.
12. Sharman D. F., in: H. Blaschko, Z. Muscholl (Eds.): Handbook of Experimental Pharmacology, XXXIII, p. 110, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972.

13. Seiler N., Wiechmann M. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1493 (1969).
14. Yoshino Y., DeFedis F. V., Elliott K. A. C. Can. J. Biochem., **48**, 147 (1970).
15. Seiler N., Askar A. J. Chromatogr., **62**, 121 (1971).
16. Harik S. I., Pasternak G. W., Snyder S. H. Biochim. Biophys. Acta, **304**, 753 (1973).
17. Stavinoha W. B., Weintraub S. T., Modak A. T. J. Neurochem., **23**, 885 (1974).
18. Beaven M. A., in: L. L. Iversen, S. D. Iversen, S. H. Snyder (Eds.): Handbook of Psychopharmacology, vol. 1, p. 26, Plenum Press, New York-London, 1975.
19. Saavedra J. M. Prog. Anal. Chem., **7**, 33 (1974).
20. Saelens J. K., Schoen M. S., Kovacsics G. B. Biochem. Pharmacol., **16**, 1043 (1967).
21. Peuler J. D., Johnson G. A., Life Sci., **21**, 625 (1977).
22. Passon P. G., Peuler J. D., Anal. Biochem., **51**, 618 (1973).
23. Vlachakis N. D., Mendlowitz M. Clin. Res., **24**, 621A (1976).
24. Blaedel W. J., Anderson T. J. Anal. Chem., **43**, 521 (1971).
25. Rentzhog L., Acta Physiol. Scand. Suppl., **377**, 1 (1972).
26. Henry D. P., Starman B. J., Johnson D. G., Williams R. H. Life Sci., **16**, 375 (1975).
27. Cuello A. C., Hiley R., Iversen L. L. J. Neurochem., **21**, 1337 (1973).
28. Wersé V., Kopin J. Life Sci., **19**, 673 (1976).
29. Matthias F. R. Klin. Wschr., **50**, 243 (1972).
30. Saavedra J. M., Brownstain M., Axelrod J. J. Pharmacol. Exp. Ther., **186**, 508 (1973).
31. Saavedra J. M., Axelrod J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 769 (1973).
32. Saavedra J. M. Anal. Biochem., **59**, 628 (1974).
33. Snyder S. H., Baldessarini R. J., Axelrod J. J. Pharmacol. Exp. Ther., **153**, 544 (1966).
34. Taylor K. M., Snyder S. H. J. Neurochem., **19**, 1343 (1972).
35. Kobayashi Y., Maudsley D. V. Anal. Biochem., **46**, 85 (1972).
36. Saelens J. K., Allen M. P., Simke J. P. Arch. Int. Pharmacodyn., **186**, 279 (1970).
37. Reid W. D., Haubrich D. R., Krishna G. Anal. Biochem., **42**, 390 (1971).
38. Shea P. A., Aprison M. H. Anal. Biochem., **56**, 165 (1973).
39. Wonnacott S. Biochem. Soc. Trans., **3**, 102 (1975).
40. Waldenlind L. Biochem. Pharmacol., **24**, 1339 (1975).
41. Massarelli R., Durkin T., Niedergang C., Mandel P. Pharmacol. Res. Commun., **8**, 407 (1976).
42. Calne D. B., Karoum F., Ruthven C. R. J., Sandler M. Br. J. Pharmacol., **37**, 57 (1969).
43. Lhuguenot J. C., Maume B. F. J. Chromatogr. Sci., **12**, 411 (1974).
44. Lovelady H. G. Biochem. Med., **15**, 130 (1976).
45. Wang M. T., Imai K., Yoshioka M., Taniura Z. Clin. Chem. Acta, **63**, 13 (1975).
46. Curtius H. Ch., Wolfensberger M., Steinmann B., Redweik V., Siegfried J. J. Chromatogr., **99**, 529 (1974).
47. Miyezaki H., Hashimoto Y. J. Chromatogr., **99**, 575 (1974).
48. Holdiness M. R., Rosen M. T., Justice J. B., Neill D. B. J. Chromatogr., **198**, 329 (1980).
49. Wiesel F. A., Fri C. G., Sedvall G. J. Neurol. Transm., **35**, 319 (1974).
50. Watson E., Travis B., Wilk S. Life Sci., **15**, 2167 (1974).
51. Gelpi E., Peralta E., Segura J. J. Chromatogr. Sci., **12**, 701 (1974).
52. Callabeni F., Koslow S. H., Costa E. Science, **178**, 166 (1972).
53. Swahn C.-G., Sandgarde B., Wiesel F.-A., Sedvall G. Psychopharmacology, **48**, 147 (1976).

54. Beck O., Wiesel F.-A., Sedvall G. J. *Chromatogr.*, **134**, 407 (1977).
55. Artigas F., Gelpi E. *Anal. Biochem.*, **92**, 233 (1979).
56. Kissinger P. T. *Anal. Chem.*, **49**, 447A (1977).
57. Keller R., Oke A., Mefford I., Adams R. N. *Life Sci.*, **19**, 955 (1976).
58. Riggins R. M., Kissinger P. T. *Anal. Chem.*, **49**, 2109 (1977).
59. Wagner J., Palfreyman M., Zraika M. J. *Chromatogr.*, **164**, 41 (1979).
60. Meek J. L., Neckers L. M. *Brain Res.*, **91**, 336 (1975).
61. Beck O., Palmkog G., Hultman E. *Clin. Chim. Acta*, **79**, 149 (1977).
62. Davis T. P., Gehrike C. W., Gehrke C. W. Jr., Cunningham T. D., Kuo K. C., Gerhardt K. O., Johnson H. D., Williams C. H. *Clin. Chem.*, **24**, 1317 (1978).
63. Meek J. L. *Anal. Chem.*, **48**, 375 (1976).
64. Wightman R. M., Plotsky P. M., Strobe E., Delcore R. Jr., Adams R. N. *Brain Res.*, **131**, 345 (1977).
65. Felice L. J., Kissinger P. T. *Anal. Chem.*, **48**, 794 (1976).
66. Felice L. J., Bruntlett C. S., Kissinger P. T. *J. Chromatogr.*, **143**, 407 (1977).
67. Sasa S., Blank C. L. *Anal. Chem.*, **49**, 354 (1977).
68. Scratchley G. A., Masoud A. N., Stogs S. J., Wingard D. W. *J. Chromatogr.*, **169**, 313 (1979).
69. Hefti F. *Life Sci.*, **25**, 775 (1979).
70. Warsh J. J., Chiu A., Godse D. D., Coscina D. V. *Brain Res. Bull.*, **4**, 567 (1979).
71. Koch D. D., Kissinger P. T. *J. Chromatogr.*, **164**, 441 (1979).
72. Garnier J. P., Bousquet B., Dreux C. J. *Liq. Chromatogr.*, **2**, 539 (1979).
73. Mefford I. M., Barchas J. D. *J. Chromatogr.*, **181**, 187 (1980).
74. Kilts C. D., Breese G. R., Mailman R. B. *J. Chromatogr.*, **225**, 347 (1981).
75. Watson E. *Life Sci.*, **28**, 493 (1981).
76. Wenk G., Greenland R. *J. Chromatogr.*, **183**, 261 (1980).
77. Anderson G. M., Batter D. K., Young J. G., Shaywitz B. A., Cohen D. J. *J. Chromatogr.*, **181**, 453 (1980).
78. Warsh J. J., Chiu A., Li P. P., Godse D. D. *J. Chromatogr.*, **183**, 483 (1980).
79. Wagner J., Palfreyman M., Zraika M. J. *Chromatogr.*, **164**, 41 (1979).
80. Sasa S., LeRoy C. *Anal. Chem.*, **49**, 354 (1977).
81. Svendsen H., Greibrokk T. *J. Chromatogr.*, **213**, 429 (1981).
82. Kobayashi S.-I., Sekino J., Honda K., Imai K. *Anal. Biochem.*, **112**, 99 (1981).
83. DaPrada M., Zürcher G. *Life Sci.*, **19**, 1161 (1976).
84. Müller T., Hofschuster E., Kuss H.-J., Weller D. *J. Neurol. Transm.*, **45**, 219 (1979).
85. Hajdu P., Palm D., Uihlein M., in: Abstracts IV European Congress of Clinical Chemistry, Vienna, 1981.
86. Schill G., Borg K. O., Modin R., Persson B. A., in: Progress in Drug Metabolism, vol. 2, Chap. 5, John Wiley and Sons, New York, 1977.
87. Ulin B., Gustavii K., Persson B. A. *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 672 (1976).
88. Fonnun F. *Biochem. J.*, **115**, 465 (1969).
89. Westerlund D. *Acta Pharm. Suec.*, **9**, 47 (1972).
90. Westerlund D., Borg K. O. *Anal. Chim. Acta*, **67**, 89 (1973).
91. Persson B. A. *Acta Pharm. Suec.*, **8**, 193 (1972).
92. Persson B. A. *Acta Pharm. Suec.*, **8**, 217 (1971).
93. Seiler N., Demisch L., Schneider H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **10**(1) 51 (1971).
94. Weil-Malherbe H., Bone A. D. *Biochem. J.*, **67**, 65 (1957).
95. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S. *Anal. Chem.*, **30**, 1190 (1958).
96. Samejima K., Kawase M., Sakamoto S., Okada M., Endo Y. *Anal. Biochem.*, **76**, 392 (1976).
97. Shoup R. E., Kissinger P. T. *Clin. Chem.*, **23**, 1268 (1977).

98. *Schwedt G.* Clin. Chim. Acta, **51**, 247 (1974).
99. *Anton A. H., Sayre D. F.* J. Pharmacol. Exp. Ther., **138**, 360 (1962).
100. *Keller R., Oke A., Mefford I., Adams R. N.* Life Sci., **17**, 995 (1976).
101. *O'Hanlon J. F. Jr., Campuzano H. C., Horvath S. M.* Anal. Biochem., **34**, 560 (1970).
102. *Higa S., Suzuki T., Hayashi A., Tsuge I., Yamaniura Y.* Anal. Biochem., **77**, 18 (1977).
103. *Moyer T. P., Jiang N. S., Tyce G. M., Sheps S. G.* Clin. Chem., **25**, 256 (1979).
104. *Gelijckens C. F., DeLeenheer A. P. J.* Chromatogr., **183**, 78 (1980).
105. *Kissinger P. T., Bruntlett C. S., Shop R. E.* Life Sci., **28**, 455 (1981).
106. *Mackay A. V. P., Yates C. M., Wright A., Hamilton P., Davies P. J.* Neurochem., **30**, 841 (1978).
107. *Cross A. J., Joseph M. H.* Life Sci., **28**, 499 (1981).
108. *Koch D. D., Kissinger P. T. J.* Chromatogr., **164**, 441 (1979).
109. *Koch D. D., Kissinger P. T.* Life Sci., **26**, 1099 (1980).
110. *Koch D. D., Kissinger P. T.* Anal. Chem., **52**, 27 (1980).
111. *Lankelma J., Poppe H. J.* Chromatogr., **149**, 587 (1978).
112. *Ogan K., Katz E., Slavin W. J.* Chromatogr. Sci., **16**, 517 (1978).
113. *Voelter W., Kronbach T., Zech K., Huber R. J.* Chromatogr., **239**, 475 (1982).
114. *Nakajima T., Wolfgram F., Clark W. G. J.* Neurochem., **14**, 1113 (1967).
115. *Baba S., Ogiya S.* Yakugaku Zasshi, **89**, 399 (1969).
116. *Halano H., Sumizu S., Rokushika S., Murakami F.* Anal. Biochem., **35**, 377 (1970).
117. *Wall R. A. J.* Chromatogr., **60**, 195 (1971).
118. *Vandekerkhove P., Henderickx K. J.* Chromatogr., **82**, 379 (1973).
119. *Scott C. D. J.* Chromatogr. Sci., **11**, 379 (1973).
120. *Jundera P., Churacek J. J.* Chromatogr., **98**, 1 (1974).
121. *Perry T. L., Hansen S., Foulks J. G., Ling G. M. J.* Neurochem., **12**, 397 (1965).
122. *Perry T. L., Hansen S., MacDougall L. J.* Neurochem., **14**, 775 (1967).
123. *Perry T. L., Schroeder W. A. J.* Chromatogr., **12**, 358 (1963).
124. *Perry T. L., Hestrin M., MacDougall L., Hansen S.* Clin. Chim. Acta, **14**, 116 (1966).
125. *Perry T. L., Hansen S., Jenkins I. J.* Neurochem., **11**, 49 (1964).
126. *Marton L. J., Russell D. H., Levy C. C.* Clin. Chem., **19**, 923 (1973).
127. *Marton L. J., Heby O., Wilson C. B., Lee P. L. Y.* FEBS Lett., **46**, 305 (1974).
128. *Adler H., Margoshes M., Snyder L. R., Spitzer C. J.* Chromatogr., **143**, 125 (1977).
129. *Dierick N. A., Vervaeke I. J., Decuypere J. A., Hendrickx H. K. J.* Chromatogr., **129**, 403 (1976).
130. *Udenfried S., Stein S., Böhlen P., Dairmann W., Leimgruber W., Wiegele M.* Science, **178**, 871 (1972).
- 130a. *Wiegele M., DeBernardo S. L., Tengi J. P., Leimgruber W. J.* Anl. Chem. Soc., **94**, 5927 (1972).
131. *Voelter W., Zech K. J.* Chromatogr., **112**, 643 (1975).
132. *Stein S., Bohlen P., Stone J., Dairman W., Udenfried S.* Arch. Biochem. Biophys., **155**, 202 (1972).
133. *DeBarnardo S., Wiegele M., Toome V., Manart K., Leimgruber W., Bohlen P., Steins S., Udenfried S.* Arch. Biochem. Biophys., **163**, 390 (1974).
134. *Imai K. J.* Chromatogr., **105**, 135 (1975).
135. *Marton L. J., Lee P. L. Y.* Clin. Chem., **21**, 1721 (1975).
136. *Schwedt G. J.* Chromatogr., **143**, 463 (1977).
137. *Borchardt R. T., Hegazi M. F., Schowen R. L. J.* Chromatogr., **152**, 255 (1978).

138. McMurtrey K. D., Meyerson L. R., Cashaw J. L., Davis V. E. *Anal. Biochem.*, **72**, 566 (1976).
139. Ueda E., Yoshida N., Nishimura K., Joh T., Autoku S., Tsukada K., Ganno S., Kokubu T. *Clin. Chim. Acta*, **80**, 447 (1977).
140. Persson B.-A., Karger B. L. J. *Chromatogr. Sci.*, **12**, 521 (1974).
141. Persson B.-A., Lagerstrom P. O. J. *Chromatogr.*, **122**, 305 (1976).
142. Felice L. J., Kissinger P. T. *Anal. Chem.*, **48**, 794 (1976).
143. Molnar J., Horvath C. *Clin. Chem.*, **22**, 1497 (1976).
144. Knox J. H., Jurand J. J. *Chromatogr.*, **125**, 89 (1976).
145. Riggin R. M., Kissinger P. T. *Anal. Chem.*, **49**, 2109 (1977).
146. Horvath C., Melander W., Melander J., Molnar P. *Anal. Chem.*, **49**, 2295 (1977).
147. Kraak J. C., Jonker K. M., Huber J. F. K. J. *Chromatogr.*, **142**, 671 (1977).
148. Crombeen J. P., Kraak J. C., Poppe H. J. *Chromatogr.*, **167**, 219 (1978).
149. Kissinger P. T., Riggin R. M., Alcorn R. L., Rau L. D. *Biochem. Med.*, **13**, 299 (1975).
150. Kilts C. D., Breese G. R., Mailman R. B. J. *Chromatogr.*, **225**, 347 (1981).
151. Schwedt G., Bussemas H. H. Z. *Anal. Chem.*, **283**, 23 (1977).
152. Samejima K., Kawase M., Sakamoto S., Okada M., Endo Y. *Anal. Biochem.*, **76**, 392 (1976).
153. Davis T. P., Gehrke C. W., Gehrke C. W., Cunningham T. D., Kuo K. C., Gerghardt K. O., Johnson H. D., Williams C. M. J. *Chromatogr.*, **162**, 293 (1979).
154. Asmus P. A., Freed C. R. J. *Chromatogr.*, **169**, 303 (1979).
155. Bijersbergen van Henegouwen G. M. J., Kruse G., Gerritsma K. *Pharm. Weekbl.*, **111**, 197 (1976).
156. Terweij-Groen C. P., Heemstra S., Kraak J. C. J. *Chromatogr.*, **161**, 69 (1978).
157. Knox J. H., Laird G. R. J. *Chromatogr.*, **122**, 17 (1976).
158. Seiler N., Schmidt-Glenewinkel T., Schneider H. H. J. *Chromatogr.*, **84**, 95 (1973).
159. Seiler N., Knödgen B. J. *Chromatogr.*, **131**, 109 (1977).
160. Corry R. P., Becker R. R., Rosenbluth R., Isenberg T. J. *Am. Chem. Soc.*, **90**, 1643 (1968).
161. Ivanov Ch. P., Vladovska-Yukhnovska Y. *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 345 (1969).
162. Durko I., Vladovska-Yukhnovska Y., Ivanov C. P. *Clin. Chim. Acta*, **49**, 407 (1973).
163. Ichiwaka H., Tanimura T., Nakajima T., Tamura Z. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **18**, 1493 (1970).
164. Maeda H., Ishida N., Kawauchi H., Tuzimura K. J. *Biochem. (Tokyo)*, **65**, 777 (1969).
165. Sinsheimer J. E., Hong D. D., Stewart J. T., Fink M. L., Burckhalter J. H. J. *Pharm. Sci.*, **60**, 141 (1971).
166. Lustenberger N., Lange H. W., Hempel K. *Angew. Chem.*, **84**, 255 (1972).
167. Lange H. W., Listenberger N., Hempel K. Z. *Anal. Chem.*, **261**, 337 (1972).
168. Seiler N., Schneider H. H. J. *Chromatogr.*, **59**, 367 (1971).
169. Dinges W., Naudorf G., Seiler N. J. *Chromatogr. Sci.*, **12**, 655 (1974).
170. Abdel-Monem M. M., Ohno K. J. *Chromatogr.*, **107**, 416 (1975).
171. Newton N. E., Ohno K., Abdel-Monem M. M. J. *Chromatogr.*, **124**, 227 (1976).
172. Kaltenecker B. Thesis, University of Tübingen, 1977.
173. Roth M., Hampai A. J. *Chromatogr.*, **83**, 353 (1973).
174. Maickel R. P., Miller F. P. *Anal. Chem.*, **38**, 13 (1966).
175. Simons S. S., Johnson D. F. J. *Am. Chem. Soc.*, **98**, 7098 (1976).
176. Lawrence J. F., Frei R. W. *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, 1976.

177. *Hartley B. S., Massey V. Biochim. Biophys. Acta, 21, 58 (1956).*
178. *Gray W. R., Hartley B. S. Biochem. J., 89, 380 (1963).*
179. *Rosmus J., Deyl Z. Chromatogr. Rev., 13, 83 (1971).*
180. *Seiler N. Methods Biochem. Anal., 18, 259 (1970).*
181. *Veening H., Pitt W. W. Jr., Jöhes G. J. Chromatogr., 90, 129 (1974).*
182. *Frei R. W., Thomas M., Frei I. J. Liqu. Chromatogr., 1, 443 (1978).*
183. *Froehlich P. M., Cunningham T. D. Anal. Chim. Acta, 97, 357 (1978).*
184. *Mell L. D., Dasler A. R., Gustafson A. B. J. Liq. Chromatogr., 1, 261 (1978).*
185. *Imai K., Tsukanoto M., Tamura Z. J. Chromatogr., 137, 357 (1977).*
186. *Schwedt G. J. Chromatogr., 118, 429 (1976).*
187. *Graffeo A. P., Karger B. L. Clin. Chem., 22, 184 (1976).*
188. *Yui Y., Kimura M., Itokawa Y., Kawai C. J. Chromatogr., 177, 376 (1979).*
189. *Beck O., Hesselgren T. J. Chromatogr., 181, 100 (1980).*
190. *Jackman G. P., Garson V. J., Bobik A., Skews H. J. Chromatogr., 182, 277 (1980).*
191. *Nelson L. M., Carruthers M. J. Chromatogr., 183, 295 (1980).*
192. *Schusler Van Hees M. T. I. W., Beijersbergen van Henefouwen G. M. J. J. Chromatogr., 196, 101 (1980).*
193. *Krustulovic A. M. Adv. Chromatogr., 17, 279 (1979).*
194. *Anderson G. M., Purdy W. C. Anal. Chem., 51, 283 (1979).*
195. *Krustulovic A. M., Matzura C. J. Chromatogr., 163, 72 (1979).*
196. *Krustulovic A. M., Powell A. M. J. Chromatogr., 171, 345 (1979).*
197. *Richards D. A., J. Chromatogr., 175, 293 (1979).*
198. *Cooper M. J., O'Dea R. F., Mirkin B. L. J. Chromatogr., 162, 601 (1979).*
199. *Loullis C. C., Felten D. L., Shea P. A. Pharmacol. Biochem. Behaviour, 11, 89 (1979).*
200. *Davis G. C., Kissinger P. T., Shoup R. E. Anal. Chem., 53, 156 (1981).*
201. *Oke A., Keller R., Mefford I., Adams R. N. Science, 200, 1411 (1978).*
202. *Felice L. J., Felice J. D., Kissinger P. T. J. Neurochem., 31, 1461 (1978).*
203. *Blank C. L., Sasa S., Isernhagen R., Meyerson L. R., Wassil D., Wong P., Modak A. T., Stavinoha W. B. J. Neurochem., 33, 213 (1979).*
204. *Milby K. H., Mefford I. N., Keller R. W., Adams R. N. Brain Res., 169, 398 (1979).*
205. *Goldstein D. S., Feuerstein G., Izzo J. L., Kopin I. J., Keiser H. R. Life Sci., 28, 467 (1981).*
206. *Mefford I. N., Gilberg M., Barchas J. D. Anal. Biochem., 104, 469 (1980).*
207. *Sasa S., Blank C. L. Anal. Chim. Acta, 104, 469 (1979).*
208. *Hallman H., Farnebo L. O., Hamberger B., Jonsson G. Life Sci., 23, 1049 (1978).*
209. *Hjemdahl P., Daleskog M., Kahan T. Life Sci., 25, 131 (1979).*
210. *Freed C. R., Asmus P. A. J. Neurochem., 32, 163 (1979).*
211. *Müller T. H., Unsicker K. J. Neurosci. Methods, 4, 39 (1981).*
212. *Soldin S. J., Hill J. G. Clin. Chem., 26, 291 (1980).*
213. *Morrissey J. L., Shihabi Z. K. Clin. Chem., 25, 2045 (1979).*
214. *Anderson G. M., Purdy W. C. Anal. Lett., 10, 493 (1977).*
215. *Anderson G. M., Purdy W. C. Anal. Chem., 51, 283 (1979).*
216. *Anderson G. M., Young J. G., Cohen D. J. J. Chromatogr., 164, 501 (1979).*
217. *Lyness W. H., Friedle N. M., Moore K. E. Life Sci., 26, 1109 (1980).*
218. *Longlais P. J., McEntee W. J., Bird E. D. Clin. Chem., 26, 786 (1980).*
219. *Cross A. J., Joseph M. H. Life Sci., 28, 499 (1981).*
220. *Wang M. T., Imai K., Yoshioka M., Tamura Z. Clin. Chim. Acta, 63, 13 (1975).*

Липиды

М. Тевини, Д. Штайнмюллер
(*M. Tevini, D. Steinmüller*)

7.1. Введение

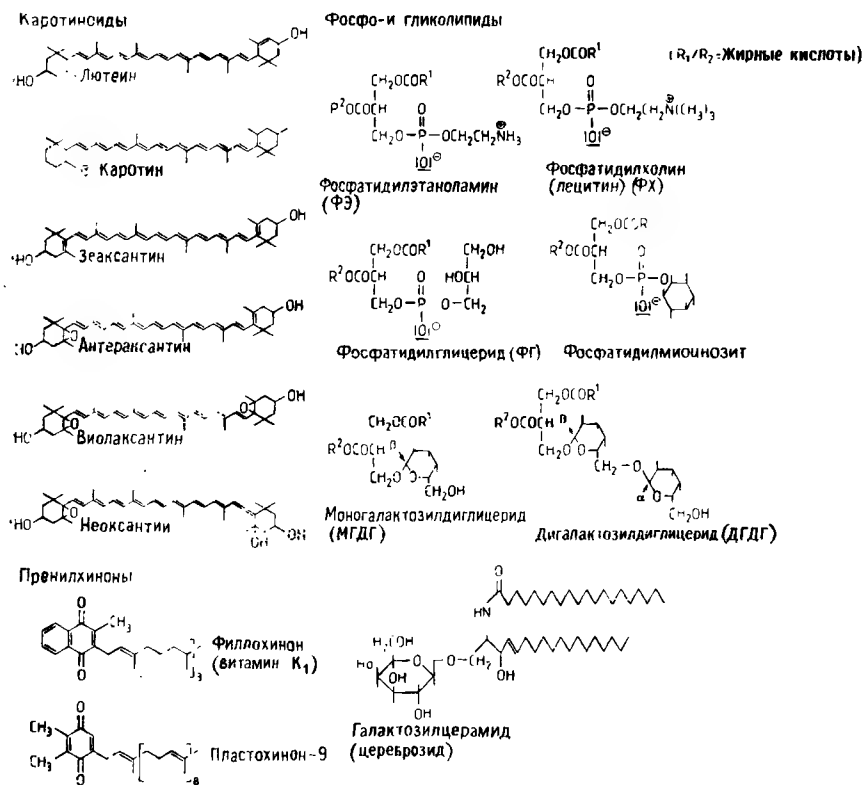
Липиды — это широкий класс соединений, содержащих липофильные цепи, что делает их растворимыми в органических растворителях и нерастворимыми в воде. Липиды условно подразделяются на две группы. К первой относятся соединения, родственные углеводородам и жирным кислотам, ко второй — родственные терпеноидам или пренолам. Представители первой группы — углеводороды и спирты с длинной цепью, жирные кислоты и их эфиры с различными спиртами, фосфолипиды (смешанные эфиры жирных кислот и фосфорной кислоты с глицерином или сфингозином) и гликолипиды (большая группа соединений, содержащих углеводный и липидный фрагменты), представители второй группы — терпеноиды с длинной цепью (например, каротиноиды), смешанные терпеноиды (например, хлорофиллы) и полипренолы с длинной цепью (например, липофильные хиноны).

Липиды — основной компонент всех мембран растительных и животных клеток, где они играют не только структурную роль, но и выполняют биохимические функции (например, в фотосинтезирующих мембранах-тилакоидах хлоропластов). В большинстве мембран липиды выполняют барьерную функцию и участвуют в контроле трансмембранного транспорта различных соединений. Липиды могут запасаться в клетках растений и животных и служить источником энергии. Резервные липиды, содержащиеся в семенах растений или тканях животных, используются для получения масел и, следовательно, представляют собой источник пищи. Именно поэтому липиды интересуют исследователей, работающих в фундаментальных и прикладных областях биохимии, биотехнологии и технологии пищевой промышленности. В целях изучения состава и свойств липидов разрабатываются новые методы их разделения и идентификации, к числу которых относится и ВЭЖХ.

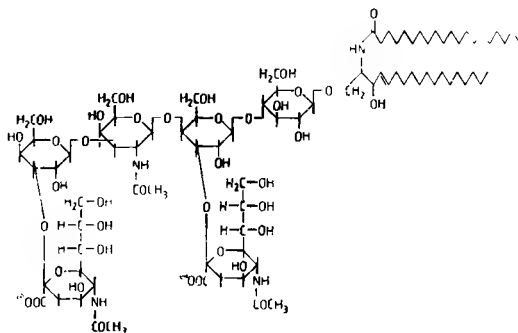
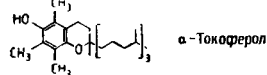
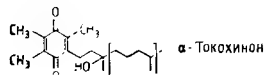
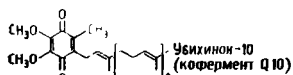
Липиды существенно различаются по полярности, что затрудняет выбор неподвижной фазы и элюента для их разделения. Например, разделение искусственной смеси глицеридов, фосфолипидов, холестерина, цереброзидов и ряда других

липидов на колонке длиной 1 м при градиентном элюировании тремя растворителями длится 3 ч [2]. Разделить же смесь липидов, полученную экстракцией из природных объектов, на индивидуальные липиды каждого класса за один хроматографический цикл, по-видимому, невозможно. Поэтому чаще всего хроматографический анализ биологических образцов сводился к групповому разделению липидов различных классов. Авторы работы [3] осуществили разделение природной смеси липидов, содержащей углеводороды, холестерин, воски и глицериды (время разделения составило 30 мин). В работе [4] предложен метод разделения экстрактов растительных липидов на липиды разных классов (каротиноиды, хлорофиллы, липофильные хиноны), ставший в настоящее время рутинным. В большинстве случаев, однако, необходима предварительная обработка экстрактов липидов. Обзор методик экстракции, очистки и предварительного фракционирования природных липидов опубликован Жуковым и Верещагиным [1].

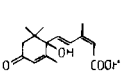
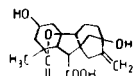
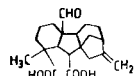
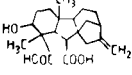
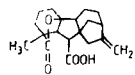
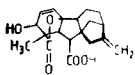
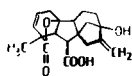
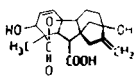
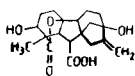
Таблица 7.1. Химическая структура ряда важных методов



Продолжение



Терпеноидные растительные
гормоны



ГК-гивберелловая кислота и ее производные
АК-абсцизовая кислота

Обнаружение липидов при разделении их по методу ВЭЖХ, как правило, осуществляется по поглощению в УФ-области спектра или рефрактометрически. Большинство мембранных, барьерных и поверхностных липидов имеют полосу поглощения в УФ-области, однако молярный коэффициент экстинкции насыщенных и моноеновых липидов относительно мал. Высокий коэффициент экстинкции имеют лишь липиды с большим содержанием ненасыщенных углеродных связей. Рефрактометрический метод недостаточно чувствителен, и его можно применять только при изократическом элюировании. Иногда для обнаружения липидов используется пламенно-ионизационный детектор с подвижной проволокой (этот метод рассмотрен Айтзетмюллером [149]), однако элюент и липиды должны при этом значительно различаться по летучести. Необходимость сжигания разделяемых соединений делает невозможным их дальнейшее изучение. Чувствительность этого метода обнаружения пример-

но такая же, как рефрактометрического. В литературе описаны примеры применения и других детекторов, в том числе ИК, сцинтилляционного, флуоресцентного и электрозахватного [24, 131, 142, 143, 149], но применяются они в основном для решения специфических проблем.

В соответствии с тем что наибольшее распространение получил фотометрический метод обнаружения, рассмотрим прежде всего липиды, обладающие способностью к поглощению в видимой и ближней УФ-области (до 250 нм). Липиды, которые поглощают в области длин волн меньше 250 нм, будут рассмотрены во втором разделе.

7.2. Пигменты и пренилхиноны

К этой группе липидов относятся все липофильные пигменты, относительно хорошо поглощающие в видимой и ближней ультрафиолетовой областях спектра. Все они содержат или системы сопряженных двойных связей (каротиноиды, производные витамина А), или хромофорный порфирин с терпеноидными спиртами в боковой цепи (хлорофиллы), или имеют хиноновые структуры с открыто цепочечными терпеноидными спиртами (пренолы или пренилхиноны — пластохиноны, убихиноны, токоферолы, витамин К).

Пигменты и пренилхиноны играют важную роль в биохимических процессах, происходящих в растительных и животных организмах. Особенно важны растительные пигменты, участвующие в фотосинтезе; эти пигменты — основной объект исследования в физиологии растений. В лаборатории авторов данной главы [4] разработан простой метод разделения таких пигментов, осуществляемого за один хроматографический цикл (рис. 7.1 и 7.2).

Наилучшее разделение наблюдается в условиях градиентного элюирования смесью метанол/вода. Так, в типичном примере элюирование начинают 85%-ным метанолом и далее в течение 20 мин повышают его концентрацию до 95—98%. В данном случае метанольный или ацетоновый экстракт растительных липидов можно наносить на колонку без какой-либо предварительной обработки. Обнаружение осуществляют УФ-детектором со сменной длиной волны, так как различные липиды имеют максимумы поглощения при различных длинах волн. УФ-детектор с постоянной длиной волны (254 нм) можно использовать для обнаружения лишь некоторых хинонов, например пластохинона, а к каротеноидам, токоферолам и другим липидам он нечувствителен. Каротеноиды, хлорофилл и пластохинон имеют высокие коэффициенты поглощения (соответственно $15 \cdot 10^4$, $8,4 \cdot 10^4$ и $1,4 \cdot 10^4$ см²/моль), что позволяет определять их содержание на уровне 0,7 (каротеноиды) и

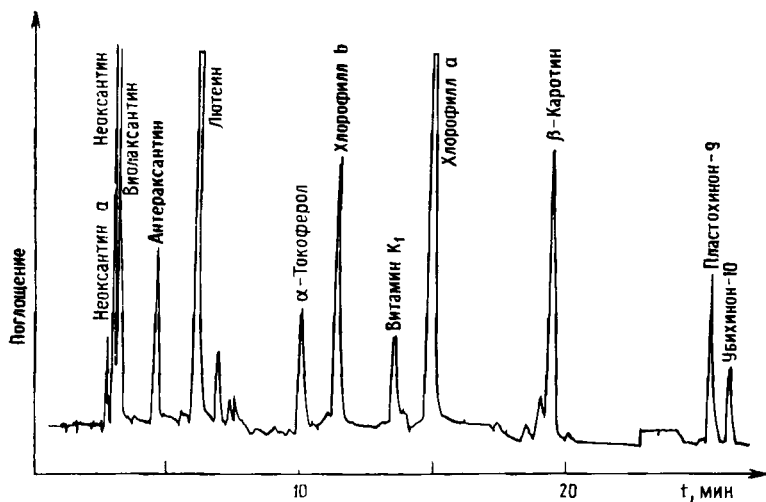


Рис. 7.1. Разделение пигментов зеленых листьев ячменя [4].

Неподвижная фаза: лихросорб RP-8, 5 мкм; элюент: метанол (Б)/Н₂O от 85 до 95% Б в течение 20 мин, далее 1,5 мин элюирование в изократическом режиме, после этого в течение 1,5 мин до 98% Б; объемная скорость: 2,5 мл/мин, температура: 40 °С; обнаружение: УФ-детектор со сменной длиной волны, программирование длин волн по максимуму поглощения каждого из разделяемых соединений (Тевнин, неопубликованные данные).

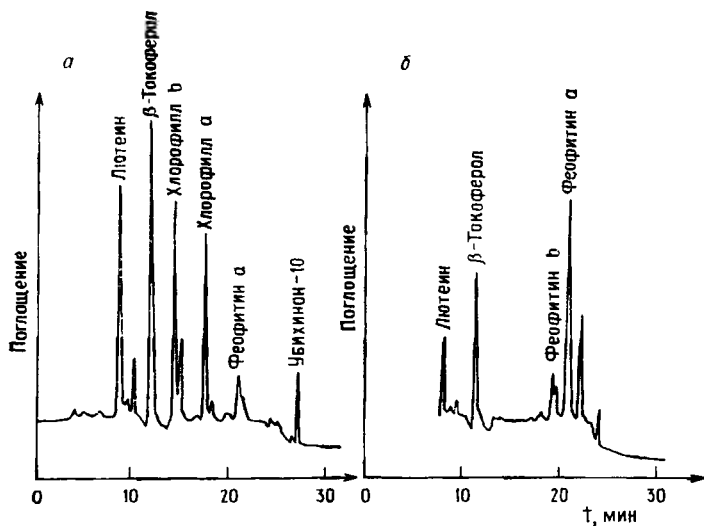


Рис. 7.2. Разделение пигментов гороха, подвергнутого промышленной сушке (а) и последующему кипячению (б) (Тевнин, неопубликованные данные). Условия разделения см. в подписи к рис.7.1. Начало градиентного элюирования с 82% Б.

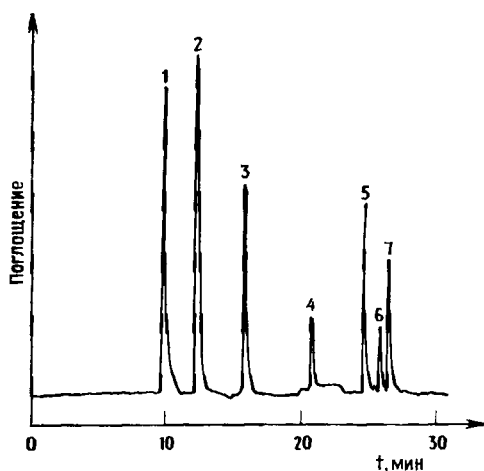


Рис. 7.3. Разделение смеси некоторых природных пренилхинонов.

Условия разделения см. в подписи к рис. 7.1.

1 — α -токохинон; 2 — α -токоферол; 3 — витамин K_1 ; 4 — пластогидрохинон-9; 5 — убихинон-9; 6 — пластохинон-9; 7 — убихинон-10.

1,7 нг (хлорофиллы) при 430 нм в обоих случаях. Методом ВЭЖХ с УФ-детектором с переменной длиной волны возможно обнаружение следующих количеств пренилфенолов: пластохинон (ПХ-9, окисленная форма, при 255 нм) 5,6 нг, витамин K_1 (при 265 нм) 4,2 нг, α -токоферол (α -Т, при 290 нм) 17,5 нг. Однако разделить ксантофиллы лютеин и зеаксантин на этой колонке невозможно. Поскольку восстановленную форму пластохинона ПХ-Н₂ не удастся отделить от β -каротина, содержащую их пробу хроматографируют дважды, причем один раз обнаружение осуществляют при 470 нм (β -каротин), второй раз — при 290 нм (ПХ-Н₂). Можно также окислить ПХ-Н₂ до ПХ хлоридом железа, в этом случае во время второго хроматографического цикла обнаружение проводят при 255 нм. Пример разделения искусственной смеси пренилхинонов приведен на рис. 7.3. Ксантофилловые эфиры можно также разделять при помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонке с неподвижной фазой C_8 при градиентном элюировании метанольной смесью (до 100%), рис. 7.4. Время удерживания ксантофилловых эфиров зависит от длины цепи и степени насыщенности связанных жирных кислот.

В опадающих осенью желтых листьях содержится значительное количество лютеиновых эфиров со сложным жирнокислотным составом, разделить которые в описанных выше условиях не представляется возможным. Жирные кислоты, входящие в состав ксантофилловых эфиров, оказывают недостаточно сильное влияние на молярный коэффициент поглощения, чтобы их можно было разделить в соответствии с содержащимися в них жирокислотными радикалами.

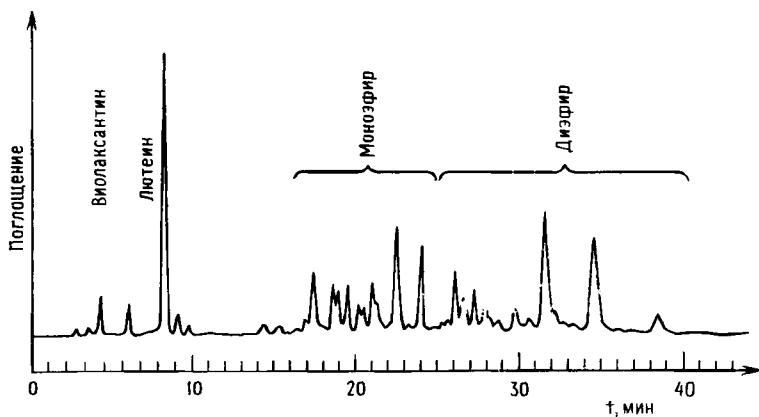


Рис. 7.4. Разделение каротиноидов, входящих в состав желтых (осеиних) листьев *Aesculus hippocastanum* L. (Тевини и Ридман, неопубликованные данные).

Условия разделения см. в подписи к рис. 7.1. Градиентное элюирование ведется в течение 25 мин от 85 до 100% Б; обнаружение: при 430 нм.

Аналогичные обращенно-фазовые и нормально-фазовые колонки были использованы рядом авторов для разделения каротиноидов и эфиров хлорофилла высших растений и водорослей [5—11]. Авторы работы [12] описали разделение хлорофиллов на колонках с обращенной фазой C_{18} при элюировании смесью метанол/вода/этилацетат. В табл. 7.2 суммированы примеры разделения растительных пигментов.

Обращенно-фазовая хроматография пригодна также для разделения различных токоферолов (α - и δ -токоферолов, α - и δ -токотриенолов), входящих в состав растительных масел. Жирорастворимые витамины впервые были разделены в 1972 г. [17]; этой же проблеме посвящен ряд более поздних публикаций [18—21]. Некоторые авторы для обнаружения токоферолов применяют детекторы по флуоресценции (рис. 7.5), обладающие большей чувствительностью, чем УФ-детекторы [22—24]. В табл. 7.3 суммированы данные по разделению при помощи ВЭЖХ токоферолов и других пренолов.

Растительные пренилхиноны и терпеноиды были разделены на двух колонках с неподвижными фазами различной полярности [16, 25—28].

7.2.1. Витамин А

Соединения витамина А и их производные, включая ретинол, ретиналь, ретиноевую кислоту, ретиниловые эфиры и т. д., можно успешно разделять при помощи обращенно-фазовой

Таблица 7.2. Методы разделения некоторых растительных пигментов при помощи ВЭЖХ

Соединения ^{а,б}	Неподвижная фаза и колонка	Элюент ^в	Длина водны, мм	Литера- тура
Хл <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> , Фео <i>a</i> , Л, Нкс, Вкс, β-К, диноксантины	Бондапак C ₁₈ (37—75 мкм), две по 61 см, последова- тельно соединенные	CH ₃ OH/H ₂ O Эфир/CH ₃ OH (ст. гр.)	440	5
Хл <i>a</i> , <i>a'</i> , <i>b</i> , <i>b'</i> , Фео, Л, Нкс, Вкс	Силикагель SS-05 (0,5 мкм), 65 см	Изопропанол/гексан	380	13—15
Хл <i>a</i> , <i>b</i>	Партисил PXS, ODS 2	CH ₃ OH/H ₂ O (95 : 5)	654	6
Хл <i>a</i> , <i>b</i> , Л, Нкс, Акс, Вкс, β-К	Нуклеосил (5 мкм)	Изооктан/C ₂ H ₅ OH (9 : 1)	445	7
Хл <i>a</i> , <i>b</i> , Л, Нкс, Вкс, Акс, Зкс	Лихросорб RP-8 (5 мкм)	CH ₃ OH/H ₂ O (9 : 1)	430	16
Хл <i>a</i> , <i>a'</i> , <i>b</i> , Фео, β-К, Вкс, Нкс-А, А, Л-эп, Нкс, Акс	Сорбсил 60-D-10, C-18	C ₂ H ₅ OH/CH ₃ OH/H ₂ O (ст. гр.)	440	8
Хл <i>a</i> , <i>c</i> ₁ , <i>c</i> ₂ , Хлид <i>a</i> , β-К, пи- ридины, диноксантины	Партисил 10 ODS, бондапак CN, C ₁₈	CH ₃ OH/H ₂ O (гр.)	640, 440	10
Хл <i>a</i> , <i>b</i> , Фео <i>a</i> , <i>b</i> , Нкс, Нкс-А, Л, Акс, β-К, ксантофилловые эфиры, хиноны	Лихросорб RP-8 (5 мкм)	CH ₃ OH/H ₂ O (гр.)	Переменная	4, 11
Хл <i>a</i> , <i>b</i> , Акс, Вкс, Л, β-К, α-К, Л-эк, <i>цис/транс</i> : Нкс, три- гидр. α-К	Лихросорб RP-8 (5 мкм)	CH ₃ OH/ацетонитрил/H ₂ O (25 : 75) (гр.)	430	9
Хл <i>a</i> , Хлид <i>a</i> , Плид <i>a</i> , β-К, Нкс, Вкс, Л, Л-эп	Лихросорб RP-18 C ₁₈	CH ₃ OH/H ₂ O/этилацетат (гр.)	436	12
Феофитиновые эфиры	Лихросорб RP-8 (5—10, 5— 20 мкм), препаративная	CH ₃ OH/H ₂ O, CH ₃ OH/ацетон	410, 667, 534	147
Бактерио-Хл <i>a</i> + <i>b</i> -эфиры	Лихросорб RP-8 (5—10 мкм)	CH ₃ OH/H ₂ O	Переменная	148

^а Хл — хлорофилл, Фео — феофитин, Хлид — хлорфиллид, Плид — протохлорофиллид, Л — лютеин, Л-эп — 5,6-эпоксилютеин, Нкс — неоксантин, Нкс-А — неоксантин А, Вкс — виолаксантин, α- и β-К — α- и β-каротин, Акс — антерксантин, Зкс — зеаксантин.

^б Изомеры хлорофилла *a'* и *b'* не являются природными пигментами, а образуются в результате экстракционных процессов (Бэкон и Холлен 1967). Впервые описаны Стрейном и Манигом (1942) и Стрейном (1954).

^в Ст. гр. — ступенчатый градиент, гр. — градиентное элюирование.

Таблица 7.3. Методы разделения производных некоторых природных пренилхинонов

Соединения ^a	Неподвижная фаза и колонка	Элюент	Длина волны, нм	Литература
Токоферолы α , β , γ , δ Токотриенолы α , β , γ , δ Токоферолы α , α -TX Токотриенолы α , β , ПХ-1, 9, ви- тамины K ₁ , K ₂ , менахинон-4, терпеноиды Токоферолы α , γ	Корасил II (37—50 мкм), 2 м Лихросорб RP-8 (5 мкм) Лихросорб SI-60 (5 мкм)	0,5% ТГФ в гексане 4,75% H ₂ O в CH ₃ OH 1% диоксана в гексане	254 или 280 220, 254 } 265, 290 }	18 25, 27, 145
Токоферолы α , β , γ , δ	Корасил (предколонка) и бон- дапак C ₁₈ Сферисорб (5 мкм) Корасил (предколонка) и пар- тисил PXS-5	CH ₃ OH/H ₂ O (97 : 3) 1,4% изопропанола в гексане	Флуоресценция, 330 Флуоресценция, 340	22 23
Токоферолы α , β , γ , δ	Лихросорб SI-60 (5 мкм)	5% диэтилового эфира в гек- сане	292; флуоресцен- ция, 330	24
Токотриенолы α , β , γ Токоферолы, УХ, витамины А, К	Нуклеосил C ₁₈ Партисил ODS Лихросорб диол Бондапак C ₁₈ Лихросорб SI-60, диаметр 16 мм (препаративная)	C ₂ H ₅ OH/H ₂ O или изопропанол/ гексан 100%-ный ацетонитрил 0,5% изопропанола в изеокта- не	УФ 254 296	28 20 19
Витамины Е-хиноны, токоферол, хинон Токоферолы α , β , γ , δ , витаминны D ПХ-9, ПХ-H ₂ , витамин K ₁ , каро- тиноиды	Порасил Бондапак C ₁₈ Лихросорб SI-10 Лихросорб RP-8 (5 мкм)	Дихлорэтан/гептан (6 : 9) CH ₃ OH/изопропанол (3 : 1) CH ₃ OH/H ₂ O (градиентное элюирование)	254 Переменная 285,5	29 4 21
Токоферолы α , β , α -TX, УХ-9, 10, витамины K ₁ , ПХ-9, ПХ-H ₂ , хло- рофиллы, каротиноиды Токоферолы α , γ , α -ацетат токо- хинона	Партисил ODS (10 мкм) Сферисорб ODS (5 мкм), 15 см	CH ₃ OH/H ₂ O (87 : 13 или гра- диентное элюирование)	275	

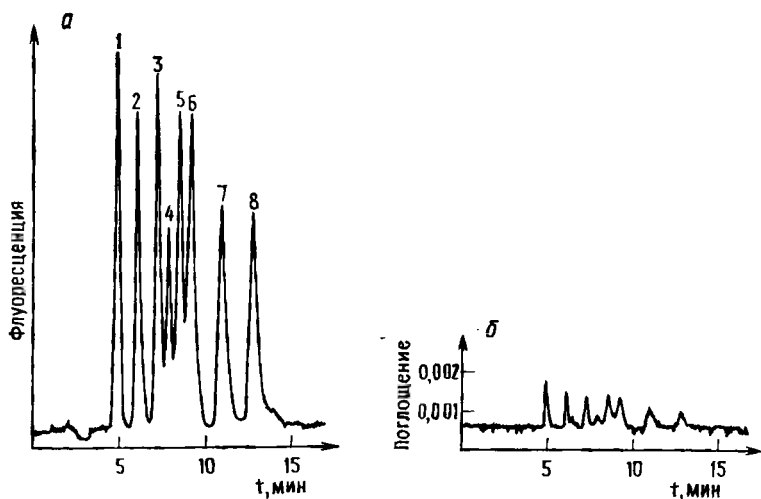


Рис. 7.5. Разделение токофероловых и токотриеноловых стандартов [24].

Неподвижная фаза: лихросорб SI-60, 5 мкм; элюент: 5%-ный диэтиловый эфир в гексане; объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: детектор по флуоресценции (а) (возбуждение при 290 нм и испускание при 330 нм) и УФ-детектор (б) (при 295 нм). 1 — α -токоферол; 2 — α -токотриенол; 3 — β -токоферол; 4 — антиоксидант ВНА; 5 — γ -токоферол; 6 — β -токотриенол; 7 — γ -токотриенол; 8 — δ -токоферол.

(C_{18}) или «нормально-фазовой» (силикагель, NH_2) хроматографии. Обнаружение в большинстве случаев осуществляют УФ-детектором при длине волны 320 и 365 нм [32—39, 150].

7.3. Жирные кислоты

Для разделения сложных смесей жирных кислот и их метиловых эфиров чаще всего используют газовую хроматографию [40, 41]. Однако разработанные к настоящему времени методики ВЭЖХ, как выяснилось, также могут применяться в этих целях (табл. 7.4). Одна из важнейших проблем, связанных с применением ВЭЖХ в этой области, — это проблема обнаружения и определения концентраций жирных кислот и родственных им липидов. Наибольшее распространение в этой области получили дифференциальный рефрактометр и УФ-детектор. Автор работ [42, 43] изучал разделение метиловых эфиров насыщенных и ненасыщенных жирных кислот на колонке с корасилом C_{18} при обнаружении их дифференциальным рефрактометром. Если элюентом служила смесь ацетонитрил/вода, ненасыщенные жирные кислоты элюировались раньше, чем соответствующие кислоты с меньшей степенью ненасыщенности, а *цис*-изомеры — раньше, чем соответствующие *транс*-изомеры. Авторы [44] разделили сложную смесь растительных масел на жирные кислоты и три-

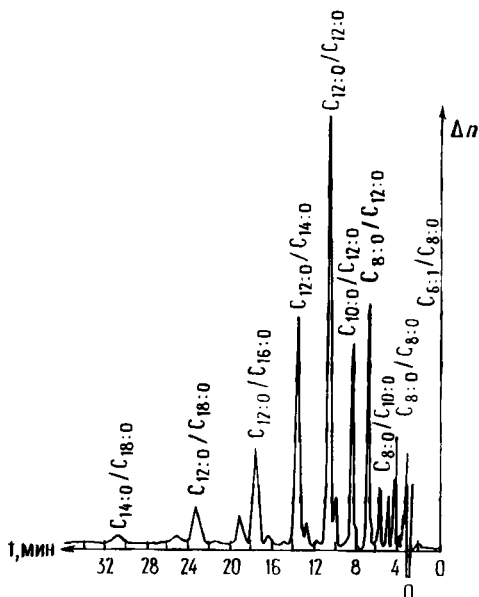


Рис. 7.6а. Разделение диэфиров жирных кислот и 1,3-бис-(2-гидроксиэтил)-5,5-диметилгидантоина (ДМГ) [45].

Неподвижная фаза: лихросорб РР-8, 5 мкм; элюент: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (93 : 7); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: рефрактометрическое.

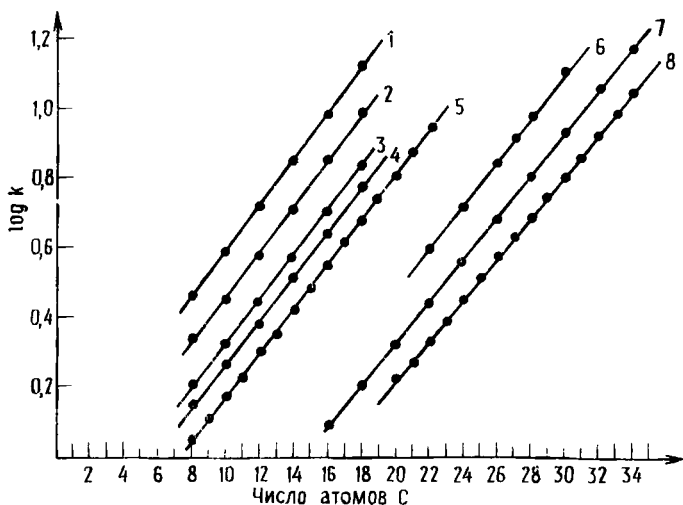


Рис. 7.6б. Зависимость $\log k$ от природы эфира и числа атомов углерода в жирнокислотном остатке [45].

Условия разделения см. в подписи к рис. 7.6а.

1 — изооктиловые эфиры; 2 — *n*-гексильовые эфиры; 3 — изобутиловые эфиры; 4 — изопропиловые эфиры; 5 — метиловыые эфиры; 6 — триметилпропиловыые триэфиры; 7 — диметилгидантоиновыые диэфиры; 8 — тетраэфиры пентаэритрита.

Таблица 7.4. Анализ жирных кислот при помощи ВЭЖХ

Обнаружение (тип производного и длина волны)	Неподвижная фаза и колонка	Элюент	Примечания	Литература
Фенацilloвые эфиры, 254 нм	Бондапак C ₁₈ , 90 см	Ацетонитрил/Н ₂ O (ступенчатый градиентный режим)	C 12—24, 24 соединения	55
	Корасил II C ₉	CH ₃ OH/Н ₂ O или гептан/хлороформ	C 2—7, 12—20, 4 соединения каждого типа	57
Свободные жирные кислоты, Δl Метилловые эфиры, Δl	Видак (35—44 мкм), 1 м	CH ₃ OH/Н ₂ O	C 6—11, 20—24 C 20 : 0—20 : 5	49
Метилловые эфиры, Δl, 254 нм	Корасил C ₁₈ , 60 см	Ацетонитрил/Н ₂ O, CH ₃ OH/Н ₂ O	C 2—18, изомеры с двойными связями	42, 43
Свободные жирные кислоты, 235 нм и 990 см ⁻¹ (ИК)	Партисил (5 мкм), 50 см	0,75% C ₂ H ₅ OH в гексане	цис/транс-C ₁₈ , метилгидроксикислоты	66, 67
Свободные жирные кислоты, 215 или 234 нм Метилловые эфиры, 205 нм	TSK-гель LS 140, 60 см	Гексан/C ₂ H ₅ OH (9 : 1)	Гидроксид-C ₁₈ , гидропероксикислоты	68
	Сферисорб S5W+AgNO ₃ (20%)	ТГФ/гексан	цис/транс-C ₁₈ , изомеры с двойными связями	47, 48
n-Хлор-, n-бром-, n-нитрофенацilloвые эфиры, 2-иафтилацилловые производные	Бондапак C ₁₈ , FFAP, 2 последовательно расположенные колонки	Ацетонитрил или ацетонитрил/Н ₂ O (градиентный режим)	C 2—24, 35 соединений	60
Бромметилметоксикумариновые флуоресцирующие производные	Микропак SI-10	Изооктан и ацетонитрил/метилехлорид (10 : 15) (градиентный режим)	C 3—18, 6 соединений	69

Метоксифенацетил-эфир, 254 или 280 нм	Бондапак C ₁₈ , 2 последовательно расположенные колонки, предколонка с ODS	Ацетонитрил/Н ₂ O (градиентный режим)	С 8—24, 12—32, 28 соединений, гидрокси- и гидрированные ненасыщенные кислоты	59, 62, 70, 71
Фенацетил-эфир, 254 нм	Бондапак C ₁₈ , 2 последовательно расположенные колонки	То же	С 10—24 из глицеридов, 26 соединений	72
<i>n</i> -Бромфенацетил-эфир, 254 нм	Сферисорб ODS	CH ₃ OH/Н ₂ O (9 : 1)	С 14—18 из триглицеридов, 7 соединений	73
Метил- $\rightarrow$ изооктил-эфир и ди- и три-эфир, Δ п	Лихросорб RP-8 (5 мкм)	CH ₃ OH/Н ₂ O, например 93 : 7	Например, С 8—24, изомеры C ₁₈	45
Бромфенацетил-эфир	Порасил С-30	Ацетонитрил/метилхлорид или ацетонитрил/Н ₂ O, или ацетонитрил/диоксан	40 соединений, С 3—24, 76—82, «критические пары»	61
	Лихросорб RP-18 (5 мкм)	Ацетонитрил/Н ₂ O, рН 3,1 (H ₃ PO ₄)	Из глицеридов С 9—20	74
<i>n</i> -Бромфенилацетил-эфир	Радиалпак AC-18 (10 мкм)	Ацетонитрил/Н ₂ O (87 : 13) или CH ₃ OH/Н ₂ O (90 : 10)	С 12—22	75
Свободные жирные кислоты, Δ п	Бондапак FFAP	ТГФ, ацетонитрил/Н ₂ O	Из природных жиров	76
	Лихросорб RP-8 (10 мкм)	ТГФ, ацетонитрил/Н ₂ O/CH ₃ COOH	Образцы маргарина	146

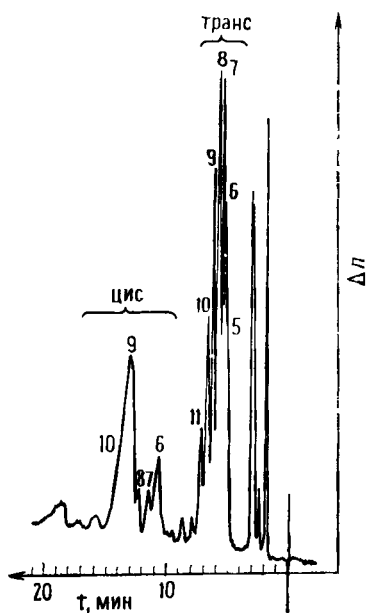


Рис. 7.7. Разделение метиловых эфиров жирных кислот [48].

Колонка: 24 см; неподвижная фаза: сферосорб S5W, пропитанный 30%-ный AgNO_3 ; элюент: 1% ТГФ в гексане; объемная скорость: 2.2 мл/мин; обнаружение: рефрактометрическое при 205 нм. Цифры на рисунке указывают на положение двойной связи в цепи, например 9=C 18 : 9.

глицериды и обнаружили линейную зависимость между числом атомов углерода и логарифмом объема удерживания.

В работе [45] описано разделение диэфиров жирных кислот (типа диметилгидантоиновых диэфиров) на обращенной фазе C_8 ; обнаружение осуществлялось рефрактометрическим детектором (рис. 7.6а). Как выяснилось, между $\log k$ и числом атомов углерода в эфирах различного типа наблюдается линейная зависимость (рис. 7.6б).

Разделение эфиров ненасыщенных жирных кислот, в частности метилстеарата, метилолеата, метилэлаидата и ряда других *цис*- и *транс*-изомеров, было проведено на колонках, пропитанных солью серебра [46—48]. На рис. 7.7 показана хроматограмма *цис*- и *транс*-изомеров, входящих в состав маргарина, полученных при разделении на сферисорбе S5W, пропитанном AgNO_3 (30%).

УФ-детектор недостаточно чувствителен по отношению к немодифицированным жирным кислотам (исключение составляют лишь кислоты с высокой степенью ненасыщенности), рефрактометрический детектор также не обеспечивает необходимую (на нанограммовом уровне) чувствительность [42, 43, 49, 50]. Однако некоторые производные жирных кислот способны сильно поглощать в УФ-области. К их числу относятся прежде всего фенациловые эфиры и их бром-, хлор- и метоксипроизводные, *п*-нитробензиловые эфиры, 2-нафтилациловые эфиры, бензило-

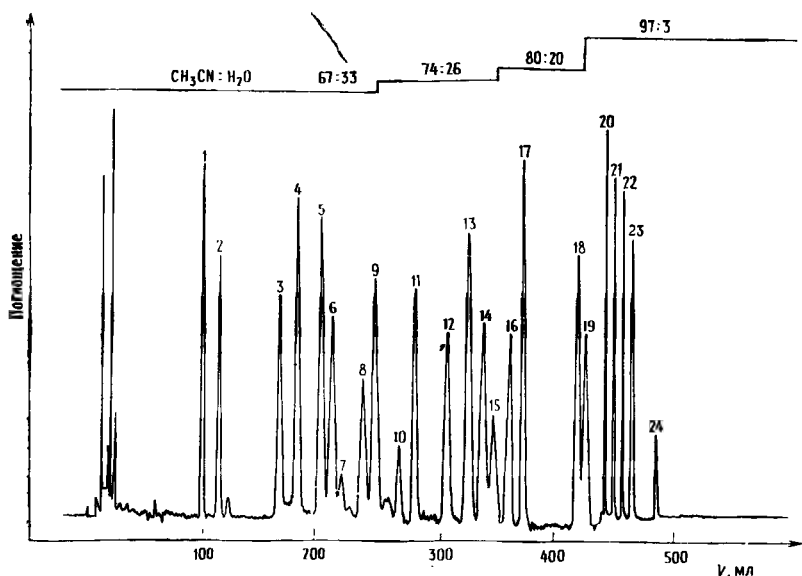


Рис. 7.8. Разделение фенилациловых эфиров жирных кислот [55].

Колонка: 90 см; неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: ацетонитрил/ H_2O , ступенчатое градиентное элюирование (верхняя кривая); объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 254 нм.
 1 — (12 : 0); 3 — (14 : 0); 9 — (15 : 0); 12 — (16 : 0); 17 — (17 : 0); 18 — (18 : 0); 21 — (20 : 0);
 6 — (20 : 4); 11 — (20 : 3); 16 — (20 : 2); 19 — (20 : 1).

вые и некоторые другие производные, используемые для проведения флуоресцентного анализа. Авторы работы [51] проводили обнаружения кислот C_{16} и C_{18} в виде бензиловых эфиров, предел обнаружения которых составлял 1—2 мкг. Согласно данным работы [52], предел обнаружения 2-нафтилациловых эфиров равен всего 4 нг. Некоторые авторы использовали для обнаружения жирных кислот их *n*-нитробензиловые эфиры [53, 54]. Однако большинство исследователей проводили разделение жирных кислот в виде фенациловых эфиров. Борг [55] разделил 24 фенилациловых эфира ряда C_{12} — C_{24} , коэффициент поглощения которых достигал $1,4 \cdot 10^4$ см²/моль (рис. 7.8). Нижний предел обнаружения этих эфиров составил 10 нг. Между площадью пиков и концентрацией кислот в пределах 100 нг — 100 мкг наблюдались линейная зависимость. Разделение проводилось на бондапаке C_{18} (длина колонки 90 см) при градиентном (ступенчатом) элюировании смесью ацетонитрил/вода. В раствор фенацилбромид, используемый для получения производных, обычно добавлялся *N,N*-диизоприпиламин (катализатор).

Другой интересный метод модифицирования жирных кислот основан на использовании в качестве ацилирующего агента

n-дибромацетофенона и краун-эфиров (например, 1, 4, 7, 10, 13, 16-гексаоксациклооктадекана) в качестве катализаторов [56, 57]. В ряде работ описано разделение замещенных фенациловых эфиров [58, 59], и, согласно данным работы [60], предел обнаружения бромфенилациловых эфиров капроновой и арахидоновой кислот составляет 2 и 10 пг соответственно. Разделение эфиров жирных кислот C_3 — C_{24} эти авторы проводили на двух или трех последовательно соединенных колонках, заполненных обращенной фазой C_{18} или фазой для распределения жирных кислот (FFA). Методы получения и применения привитых (C_{30}) фаз на основе силикагеля описаны в работе [61]. На такой колонке оказалось возможным разделить «критические пары», например α - и γ -линолевые кислоты и $C_{10}/C_{14}:1$ жирные кислоты, которые не разделяются на колонках с нормальной фазой (рис. 7.9).

Гидроксикислоты жирного ряда тоже необходимо переводить в фенилациловые эфиры [62]. На рис. 7.10 показана хроматограмма метоксифенилациловых эфиров α - и β -гидроксикислот, разделенных на двух колонках с бондапаком C_{18} при градиентном элюировании смесью ацетонитрил/вода. Жирные кислоты с короткой цепью перед разделением предварительно трифторацетилируют, чтобы увеличить длину их цепи. Обнаружение немодифицированных гидроксикислот жирного ряда проводят при 234 нм [63], коэффициент поглощения составляет около $2,8 \cdot 10^4$ см²/моль. Интересно отметить, что продукты химического или ферментативного (липоксигеназного [64, 65]) разложения жирных кислот, в частности линоленовой кислоты, разделяют при помощи ВЭЖХ [66—68]. В литературе опубликовано много других примеров разделения жирных кислот (см., например, табл. 7.4).

7.4. Глицериды (моно-, ди- и триглицериды)

Глицериды можно разделить в соответствии с их принадлежностью к различным классам липидов без учета их степени ненасыщенности или числа атомов углерода или же в соответствии с «молекулярным видом» входящих в них групп. В первом случае моно-, ди- и триглицериды (МГ, ДГ, ТГ) образуют три отдельные гомогенные зоны, содержащие чрезвычайно разнообразную смесь «молекулярных видов», разделить которые чрезвычайно трудно как при помощи ВЭЖХ, так и при помощи ГХ. В большинстве работ описывается разделение, осуществляемое в пределах одного класса липидов (чаще всего триглицеридов), в соответствии с числом атомов углерода. Хроматографирование глицеридов ведется как на обращенных, так и на полярных неподвижных фазах. Для обнаружения использу-

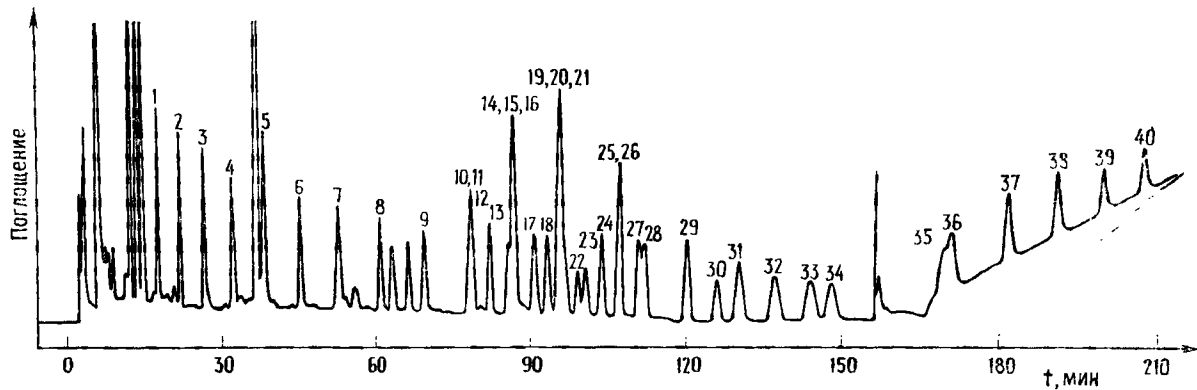


Рис. 7.9. Разделение бромфенилациловых эфиров жирных кислот [61].

Колонка: две последовательно соединенные колонки, (30 см), заполненные порасилом C_{30} ; элюент: градиентное элюирование (выпуклый градиент) от смеси ацетонитрил/ H_2O (2 : 3) до ацетонитрила (150 мин) и далее от ацетонитрила до диоксана (150 мин) (линейный градиент); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 254 нм; разделяемые кислоты: от $C_{18} : 10$ до $C_{24} : 0$.

34 — брасидиновая (22 : 1); 32 — ернауиновая (22 : 1); 27 — элаидиновая (18 : 1); 26 — ваценниновая (18 : 1); 14 — α - (18 : 3); 15 — γ - (18 : 3); 20 — линолевая (18 : 2); 22 — линолелаидиновая (18 : 2).

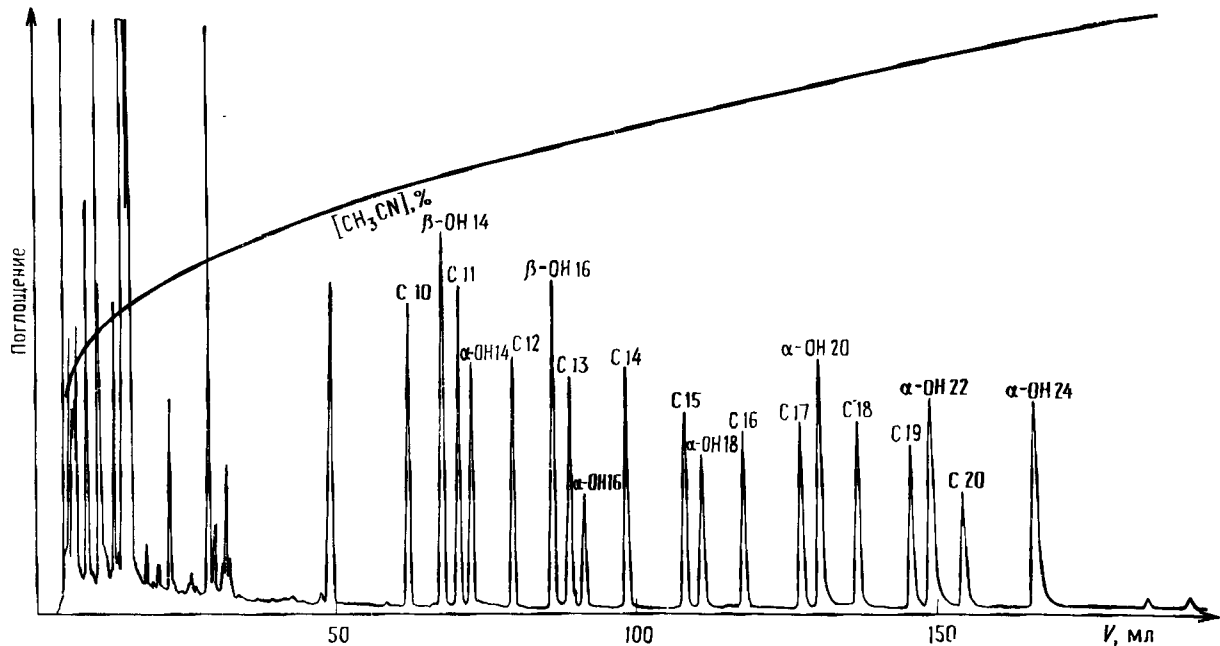


Рис. 7.10. Разделение метоксифеннлациловых эфиров α - и β -гидроксипроизводных жирных кислот [62].

Колонки: две последовательно соединенные колонки, 30 см, заполненные бондапаком C-18; элюент: ацетонитрил/ H_2O , градиентное элюирование от 40 : 60 до 100% ацетонитрила, 3 ч; объемная скорость: 1 мл/мин; температура: 38 °C; обнаружение: по поглощению при 254 нм.

ется пламенно-ионизационный (с движущейся проволокой) или рефрактометрический детектор. Предел обнаружения первым равен $\sim 0,5\text{--}2$ мкг, предел обнаружения вторым составляет 50 мкг. Осуществить полное разделение всех «молекулярных видов» в настоящее время не представляется возможным.

7.4.1. Глицериды различных классов

Все сказанное выше относительно разделения моно-, ди- и триглицеридов справедливо также применительно к нескольким другим классам глицеридов. Авторы работы [77] разделили липиды соевых бобов на 29 соединений, включая триглицериды; фосфо- и галактолипиды (два последних в виде смеси с диглицеридами), стиролы, цереброзиды и т. д. (рис. 7.11) на колонке с партисилом II при программируемом элюировании пентаном, пентан/диэтиловый эфир, хлороформ/метанол/ NH_4OH и обнаружении пламенно-ионизационным детектором с движущейся проволокой [2, 77].

В работе [3] описано разделение технических препаратов липидов, содержащих ТГ, 1,2-ДТ, 1,3-ДГ и МГ, на колонке с лихросорбом SI-60, длительность которого составила 15 мин. При элюировании системой растворителей CCl_4 /изооктан (34 : 66), хлороформ/диоксан/гексан (40 : 11 : 49), хлороформ/метанол/диизопропиловый эфир (34 : 36 : 30) кроме ДГ были также выделены свободные жирные кислоты, углеводороды, сквален, холестерин и их эфиры (рис. 7.12).

7.4.2. «Молекулярные виды»

Разделение по «молекулярным видам» в рамках липидов одного класса, отличающихся числом атомов углерода в жирной цепи, осуществляют при помощи хроматографии на обращенной фазе в изократическом режиме. Для обнаружения используют рефрактометрический детектор (рис. 7.13а). Между логарифмом времени удерживания ($\log t_R$) и числом атомов углерода (рис. 7.13б), а также числом двойных связей (при одном и том же числе атомов углерода) существует линейная зависимость (рис. 7.13в) [44].

Каждая добавочная двойная связь уменьшает время удерживания, то же самое наблюдается и при снижении числа атомов углерода. Например, время удерживания триолеата и трипальмитата совпадает, и разделить их невозможно. Наличие в молекуле гидроксид- или эпоксигрупп уменьшает время удерживания, причем сильнее, чем двойные связи. Авторы работы [78] обнаружили линейную зависимость между коэффициентом

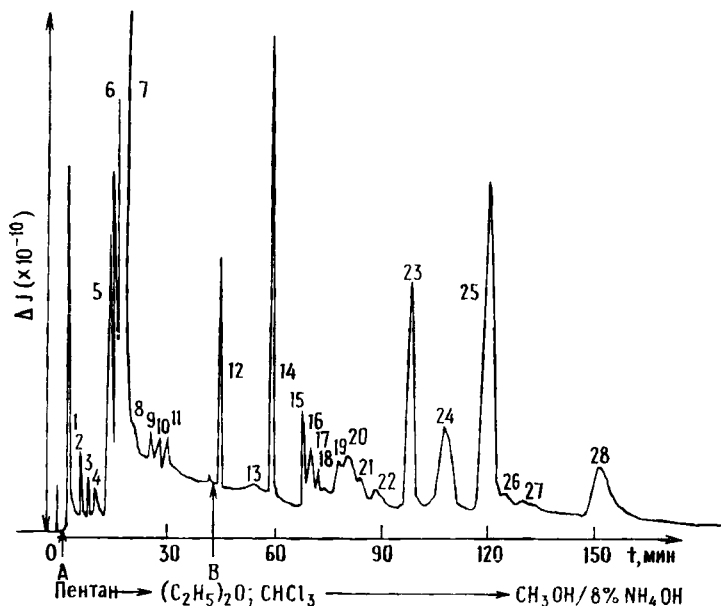


Рис. 7.11. Разделение липидов незрелых соевых бобов [77].

Неподвижная фаза: порасил II; элюент: состав и режим элюирования указаны на рисунке; обнаружение: ПИД.

1—3 — углеводороды, воски и т. д. и неидентифицированные соединения; 4, 5 — эфиры стерinov; 6 — триглицериды; 7—11, 14, 18, 20, 25, 28 — неидентифицированные вещества; 12 — стерины; 13 — свободные жирные кислоты; 15 — этерифицированные стеринглицериды; 19 — церебозид; 16 — МГДГ; 21 — ФГ; 22 — ДГДГ; 23 — ФЭ; 24 — ФИ; 25 — ФЦ; 27 — ФА; 29 — лизо-ФЦ.

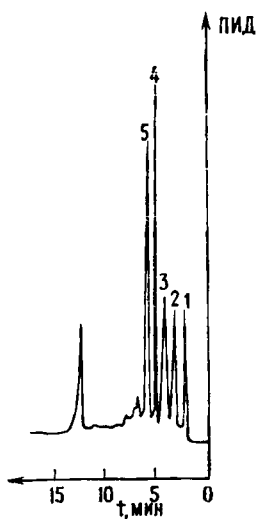


Рис. 7.12. Разделение метилированных липидов с поверхности волос человека [3].

Неподвижная фаза: лихросорб SI-60; элюент: от смеси CCl_4 /нзooктан (34:66) до смеси хлороформ/диоксан/гексан (40:11:49) и хлороформ/ CH_3OH /днйзопропиловый эфир (34:36:30); обнаружение: ПИД.

1 — холестерин; 2 — воски+эфиры холестерина; 3 — метиловыe эфиры жирных кислот; 4 — триглицериды; 5 — внутрeний стандарт (моноолеиндиацетат).

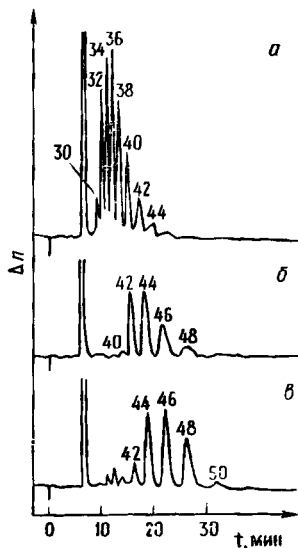


Рис. 7.13а. Разделение триглицеридов кокосового (а), кукурузного (б) и подсолнечного (в) масел [44].

Колонка: 60 см; неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: ацетонитрил/ацетон (2:1); объемная скорость: 1 мл/мин, детектор: рефрактометрический.

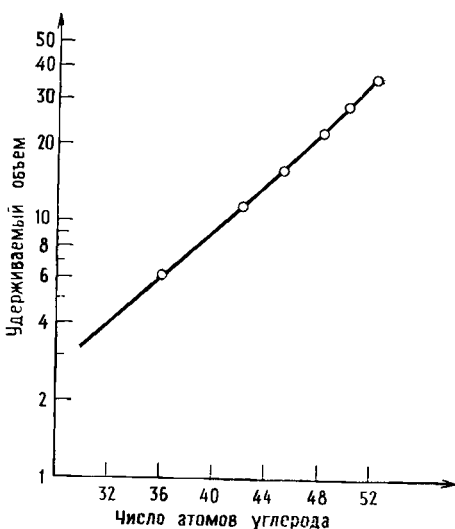
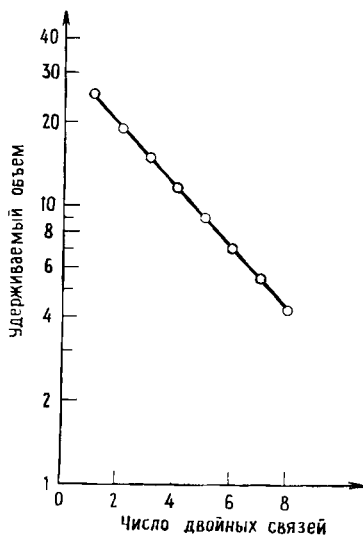


Рис. 7.13б. Зависимость удерживаемого объема от числа атомов углерода и числа двойных связей [44].

Условия разделения см. в подписи к рис. 7.13а.

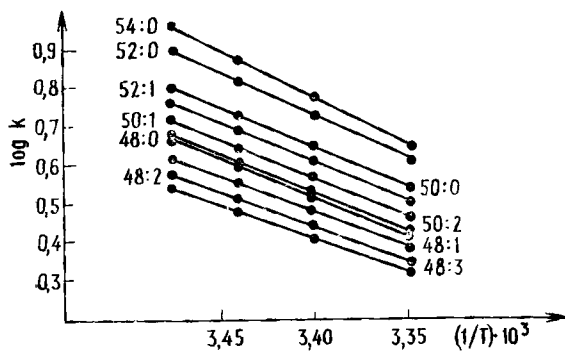


Рис. 7.14. Зависимость коэффициента емкости от обратной температуры колонки ($1/T$), установленная для ряда триглицеридов, содержащихся в растительных маслах [78].

Неподвижная фаза: лихросорб RP-18 (5 мкм); элюент: ацетонитрил/ТГФ/гексан (224 : 123,2 : 39,6); объемная скорость: 1,5 мл/мин; детектор: рефрактометрический. Цифры у прямых указывают число атомов углерода (например, 48) и число двойных связей (например, :3).

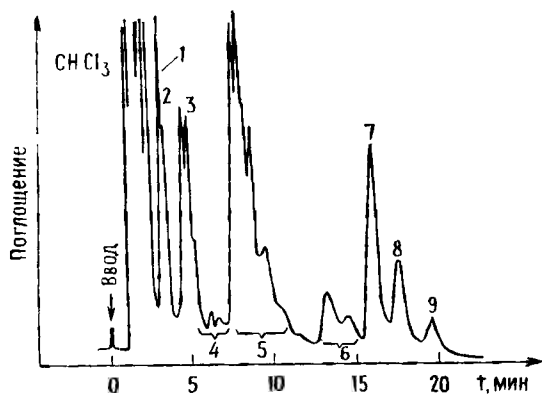


Рис. 7.15. Хроматограмма выпускаемого промышленностью эмульгатора типа Е 472 [86].

Колонка: 15 см; неподвижная фаза: партисил 5 (5 мкм); элюент: гексан/изопропанол (2% $H_2O + 0,2\% HClO_4$) (92 : 8); объемная скорость: 1,5 мл/мин.
1 — уксусная кислота + ацетилированные моноглицериды; 2 — диацетиловинный эфир диглицерида; 3 — уксусный и диацетиловинный эфиры моноглицеридов; 4 — моноглицериды; 5 — диацетилтартраты; 6 — ацетилтартраты; 7 — тартраты; 8 — диацетилтартраты; 9 — ацетил- + диацетиловинные эфиры моноглицеридов.

емкости и температурой хроматографической колонки (для колонки с обращенной фазой C_{18}) при элюировании смесью ацетонитрил/ТГФ/гексан, 224 : 123,2 : 39,6 (рис. 7.14). Оптимальная температура составляла 14,5°C. Авторы работы [79] показали, что программируемое повышение температуры в процессе разделения от 30 до 60°C улучшает разрешение и форму пиков. В работе [80] описано разделение смеси природных ТГ из арахисового и хлопкового масла на колонке с обращенной фазой C_{18} при элюировании смесью ацетонитрил/ацетон (42 : 58). Меченный ^{14}C триглицерид ^{14}C -три-18 : 1 элюировался одним пиком с выходом 98%, однако полного разделения на компоненты в соответствии с числом атомов углерода или двойных связей достигнуто не было. Анализ жирных кислот во всех выделенных фракциях при помощи ГХ показал, что только одна из фракций содержит гомогенный три-18 : 2, а все другие представляют собой смеси.

Разделение «молекулярных видов» можно проводить и на полярных неподвижных фазах. Например, на колонке с порасилом при элюировании смесью изооктан/эфир/уксусная кислота (99 : 1 : 1) была разделена смесь, в состав которой входили ТГ с более чем 54 атомами углерода [81].

Обнаружение ТГ, ДГ и МГ в природных смесях при помощи УФ-детекторов затруднено, так как коэффициенты поглощения (при 213 нм) моно-, ди- и триглицеридов с насыщенными группами C_{16} и C_{18} очень малы — от 63 до 180 см²/моль (разделение осуществлялось на колонке с лихросорбom диолом при элюировании 95%-ным водным изопропанолом) [82]. Авторы работы [88] предложили метод получения смешанных хлорид-производных ненасыщенных групп после разделения, позволяющий проводить обнаружение при 265 нм. Коэффициент поглощения при указанной длине волны пропорционален числу двойных связей.

Для обнаружения больших концентраций ТГ используют ИК-детекторы (по поглощению карбонильных групп при 5,75 мкм).

Рефрактометрические детекторы применялись для обнаружения некоторых три- и дивернолатов (вернолиевая кислота — *цис*-12, 13-эпоксидиолевова кислота), разделенных на колонке с бондапаком C_{18} при изократическом элюировании смесью ацетонитрил/вода [85].

Технические эмульгаторы, например эфиры ацетилвинной кислоты и МГ или ДГ, были разделены [86] на колонке с обращенной фазой C_{18} (рис. 7.15). Элюентом служила смесь ацетонитрил/гексан/ $HClO_4$, обнаружение проводилось при 213 нм. Эмульгаторы типа полиглицеридов были разделены на колонке с лихросорбom диолом при градиентном элюировании смесью гексан/изопропанол [87].

Таблица 7.5. Содержание полярных липидов в некоторых растительных

	мгдг	дгдг	сл	фх	фг
<i>Impatiens balsamina</i>					
зеленый лист	373,0	210,0	23,7	41,1	19,4
стебель	50,0	32,5	2,5	5,3	2,4
корень	20,6	38,6	5,2	16,2	3,1
красные лепестки	19,3	18,5	9,6	25,0	4,7
Мозг крысы ^б	—	—	—	15,1	—

^а Сокращения см. в табл. 7.1.

^б мкмоль/г [144].

7.5. Фосфолипиды и гликолипиды

Фосфолипиды и гликолипиды в основном относятся к диглицеридам, которые существенно различаются по длине цепей, входящих в них жирных кислот. Эти липиды играют важную физиологическую роль, являясь компонентами биологически активных мембран, например фотосинтезирующих мембран растений, нервных клеток животных и человека (табл. 7.5). В фосфо- и гликолипидах аминоксирит сфингозин может быть связан с жирными кислотами, а не с глицерином. Сфингозины содержатся в растительных тканях в очень малых количествах, тогда как в животных тканях — это один из основных компонентов. Плазмалогены — фосфолипиды, содержащие простые винильные эфирные связи вместо сложноэфирных, входят в состав нервных тканей. Точное определение качественного и количественного состава фосфо- и гликолипидов играет важную роль в биологии, медицине и сельском хозяйстве, поскольку характеризует изменения, вызываемые заболеваниями или изменениями внешних условий. Поэтому биологи, медики и агрохимики в последнее время проявляют большой интерес к ВЭЖХ как методу анализа мембранных липидов вообще и фосфолипидов в частности.

Методы количественного анализа фосфо- и гликолипидов при помощи ВЭЖХ рассмотрены в обзоре [88].

7.5.1. Фосфолипиды

Фосфолипиды могут быть подвергнуты разделению как в нативном виде, так и в виде производных. Обнаружение и количественное определение липидов в виде дифенилкарбонильных производных или нитробензоатов легко осуществить при помощи УФ-детектора при длине волны ~ 260 нм. Однако модифици-

и животных тканях^a

ФЭ	ФИ	ФС	ФК	ДФГ	ПЭПА	СП
30,5	7,1	0,4	—	1,3		—
9,7	3,7	1,8	—	0,3		—
26,3	3,0	2,9	—	—		—
19,8	0,5	1,7	—	—		—
7,4	1,4	4,7	1,0	0,6	15,8	3,7

рованию могут подвергаться отнюдь не все фосфолипиды, кроме того, проведение требует дополнительных затрат времени, тогда как немодифицированные фосфолипиды можно обнаруживать по поглощению при 205 нм. Ненасыщенные фосфолипиды характеризуются высоким коэффициентом поглощения при 205 нм, а насыщенные — низким. Следует, однако, отметить, что получаемые на хроматограммах немодифицированных фосфолипидов отдельные пики обычно соответствуют не индивидуальным соединениям, а смесям фосфолипидов с насыщенной или ненасыщенной жирнокислотной группой. Поэтому количественное определение немодифицированных липидов осуществить сложно, и если некоторые искусственные смеси липидов и удастся разделить полностью, то провести такое разделение сложных смесей природных липидов не представляется возможным.

7.5.1.1. Методы получения производных фосфолипидов. Для модифицирования фосфолипидов, содержащих первичную аминогруппу, например фосфатидилэтаноламина (ФЭ), фосфатидилсерина (ФС), их лизопроизводных (ЛФЭ), (ЛФС) или соответствующих плазмалогенов используют 4-бифенилкарбонилхлорид [89]. Бифенилкарбониллипиды имеют максимум поглощения при 269 нм, их коэффициент поглощения равен $2,3 \cdot 10^4$ см²/моль. Предел обнаружения составляет 0,3—0,4 нг, а диапазон линейности соответствует интервалу от 10 пМ до 20 нМ. Разделение производных липидов было осуществлено на колонке с микропаком SI-10 при элюировании смесью дихлорметан/метанол/ NH_4OH (92:8:1 или 80:15:3).

Другой метод получения производных (превращение моно- или диглицеридов в их *п*-нитробензоаты) требует больших затрат времени, но пригоден для всех фосфолипидов. Коммерческие препараты фосфолипазы С применяют для ферментативного превращения фосфолипидов в 1,2-диглицериды [90].

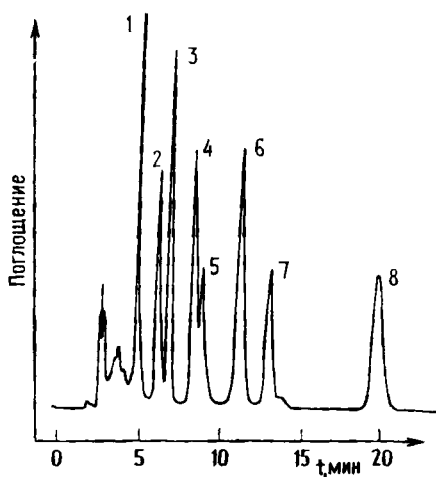


Рис. 7.16. Разделение *n*-нитробензоатов дилицеридов [90].

Неподвижная фаза: брауни RP-18 (10 мкм); элюент: изопропанол/ацетонитрил (35 : 64); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: при 254 нм.
 1 — 1,2-ди-(12 : 0); 2 — 1,2-ди-(16 : 1) (9);
 3 — 1,2-ди-(14 : 0); 4 — 1,3-ди-(18 : 1) (11);
 5 — 1,2-ди-(18 : 1) (11); 6 — 1,2-ди-(16 : 0);
 7 — 1-(18 : 0)-2-(18 : 1); 8 — 1,2-ди-(18 : 0).

Бензоаты липидов и даже некоторые «молекулярные виды» липидов были разделены на колонке с обращенной фазой C_{18} при элюировании смесью изопропанол/ацетонитрил (35 : 65 по объему) и обнаружении УФ-детектором (254 нм), предел обнаружения составил 1 нмоль ($\sim 0,6$ мкг). На рис. 7.16 приведен пример разделения 1,2-дилаурата, 1,2-димиристана, 1,2-дипальмитата, 1,2-дистеарата и ряда других соединений.

Очень чувствительный метод обнаружения фосфолипидов путем введения метки ^{32}P был с успехом применен для выявления микроколичеств липидов в крови и клетках дрожжей [91]. Меченые липиды вводили на колонку с лихросорбом SI-60 и элюировали в градиентном режиме смесью хлороформ/пропанол/уксусная кислота/вода. Обнаружение проводили настольным жидкостным сцинтилляционным счетчиком (рис. 7.17).

Элюирование смесями пропанол/толуол/уксусная кислота/ H_2O и пропанол/этилацетат/бензол/ H_2O дает хорошие результаты при разделении ФГ, ФЭ, ФИ, ФС, ФХ лизоФХ и сфингомиелина [151]. Обнаружение меченных ^{32}P липидов осуществляют при помощи проточного детектора по радиоактивности в комбинации с доступным жидкостным сцинтилляционным счетчиком. Обе системы могут работать согласованно.

7.5.1.2. Немодифицированные фосфолипиды. Немодифицированные липиды большинство исследователей обнаруживают по поглощению в УФ-области в интервале 203—213 нм. Многие органические растворители сильно поглощают в этой области, поэтому чаще всего применяются смеси ацетонитрил/метанол/вода или гексан/изопропанол/вода. Фосфатидилхолин (ФХ) и сфингомиелин были несколько лет назад разделены на колонке

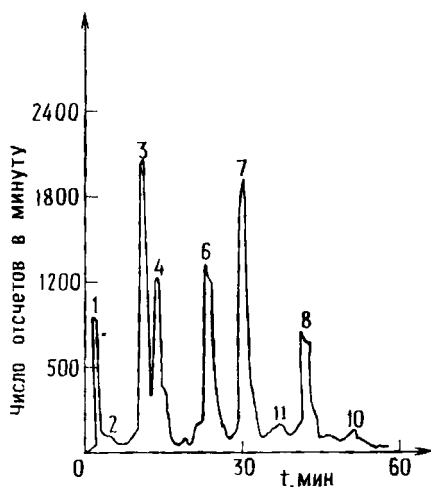


Рис. 7.17. Разделение фосфолипидного экстракта из меченных ^{32}P дрожжевых клеток [91].

Неподвижная фаза: лихросорб SI-60 (10 мкм); элюент: хлороформ/пропанол/уксусная кислота/ H_2O градиентное элюирование от 50 : 55 : 2,5 : 5 до 50 : 55 : 2,5 : 8,75 и затем до 50 : 55 : 5 : 10, объемная скорость: 0,6 мл/мин.
1 — ФА; 2 — ДФГ; 3 — ФЭ; 4 — ФГ; 6 — ФС; 7 — ФИ; 8 — ФХ; 10 — ДФИ; 11 — неидентифицирован.

с микропаком SI-10 [92], их коэффициенты поглощения при 203 нм лежат в интервале от $200 \text{ см}^2/\text{моль}$ (насыщенный ФХ-18:0) до $3,46 \cdot 10^4 \text{ см}^2/\text{моль}$ (высоконенасыщенный ФХ-20:4). Авторы работы [93] разделили смеси, содержащие практически все основные фосфолипиды, включая ФИ, ФС, ФЭ, ФХ и сфингомиелин. Элюирование проводили также смесью ацетонитрил/метанол/вода (130 : 5 : 1,5), но заменили 85% воды на фосфорную кислоту, что значительно повысило селективность разделения (рис. 7.18).

К сожалению, фосфорная кислота разрушает плазмалогены, а также затрудняет обнаружение фосфатов. Авторы работы [94, 95] расширили список выделенных фосфолипидов. На колонке с лихросорбом SI-60 при градиентном элюировании смесью гексан/изопропанол/вода (6 : 8 : 1,4 → 6 : 8 : 0,75) они разделили ФК, ФХ, ФЭ, ФИ, ФС, ЛФХ, ЛФЭ, сфингомиелин и холестерин. Обнаружение осуществлялось при 206 нм. Коэффициенты поглощения при этой длине волны лежат в пределах от $600 \text{ см}^2/\text{моль}$ (ФХ-16:0) до $1100 \text{ см}^2/\text{моль}$ (ФХ-18:1). Следует отметить, что ТГФ или диоксан образуют пероксиды, поэтому их нельзя применять для элюирования. На колонке с бондапаком- NH_2 было проведено количественное разделение ФГ, ФК, ФС, ФХ и триглицеридов. Для обнаружения был использован пламенно-ионизационный детектор с подвижной проволокой. Диапазон линейности величины сигнала детектора соответствует 50—250 мкг обнаруживаемых соединений. Для разделения смеси ряда фосфолипидов, холестерина, цереброзида и некоторых «молекулярных видов» соединений этой группы, как показано в работе [96], пригодна также колонка с ультрасилом NH_2 .

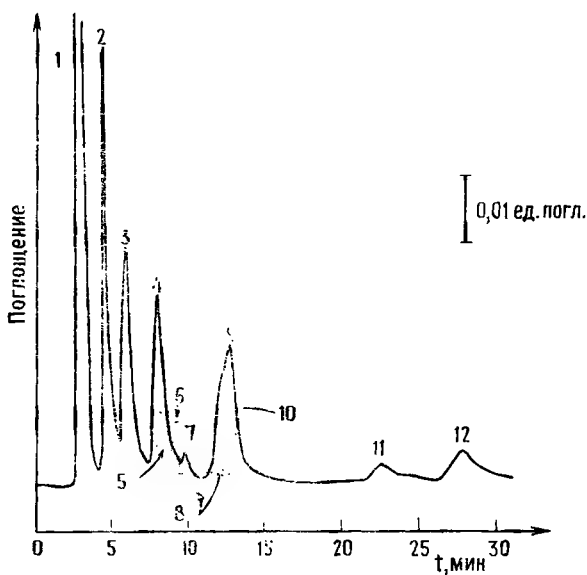


Рис. 7.18. Разделение фосфолипидных стандартов [93].

Неподвижная фаза: микропак SI-10 (10 мкм); элюент: ацетонитрил/метанол/ H_3PO_4 (85°) (130 : 5 : 1,5); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: при 203 нм.
 1 — СФ; 2 — ФИ; 3 — ФС; 4 — ФЭ; 5 — фосфатидилмонометилэтанолламин; 6 — фосфатидилдиметилэтанолламин; 7 — ЛФЭ; 8 — ФК, ФГ; 9 — ФХ; 10 — ЛРС; 11 — ЛРХ; 12 — сфингомиелин.

Элюирование велось смесями гексан/изопропанол (5,5 : 8) и гексан/изопропанол/метанол/вода (5,5 : 8 : 1 : 1,5) в ступенчатом градиентном режиме. Фосфолипиды пшеницы (колонка с порасилом) элюировали смесью гексана и изопропанола (6 : 8 по объему) при линейном увеличении содержания воды от 0,5 до 1,5% [97]. Обнаружение фосфатов проводилось по Бартлету [98] или по Фиске-Суббароу [99] при длине волны 206 нм. Сигнал детектора может быть с помощью этих методов отградуирован, однако при обнаружении приходится предполагать, что определяемый пик соответствует липиду с одним и тем же жирнокислотным остатком [100].

Авторы работы [101] провели количественное сравнение градуировки при разделении фосфолипидов при помощи ВЭЖХ и ТСХ и показали хорошее совпадение диапазона линейности градуировочной кривой в интервале от 2,5 до 20 мкг. Для лучшего разделения ФХ и сфингомиелина они рекомендовали поместить перед колонкой с лихросорбom диолом 3-см колонку с SI-60 (рис. 7.19).

Обычно селективность увеличивают в результате соответствующего подбора состава элюента и путем добавления в него

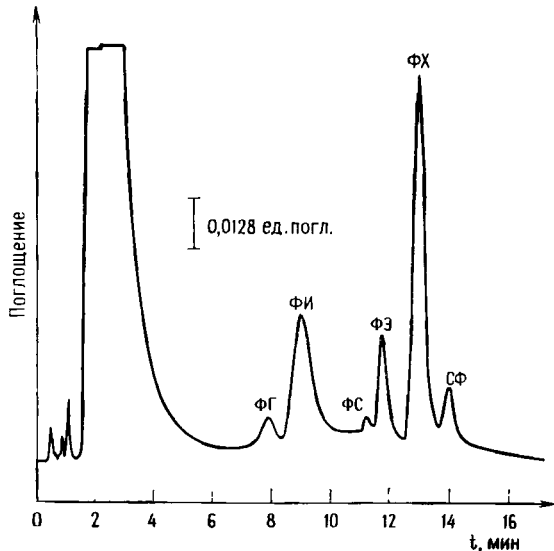


Рис. 7.19. Разделение фосфолипидов из амниотической жидкости [101].

Предколонка: 3 см, заполненная SI-60 (10 мкм); неподвижная фаза в основной колонке: лихросорб диол (10 мкм); элюент: ацетонитрил/вода (80:20) и ацетонитрил (Б), градиентное элюирование от 87,5 до 22% Б; обнаружение: при 203 нм.

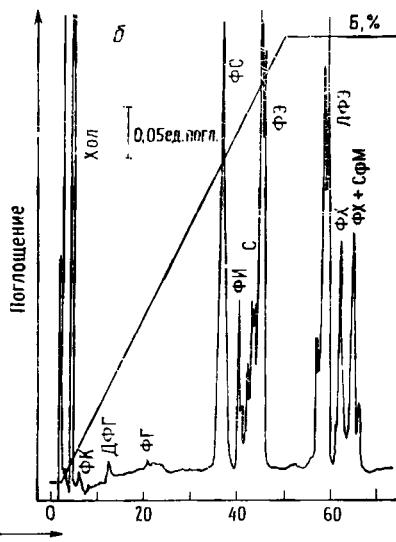
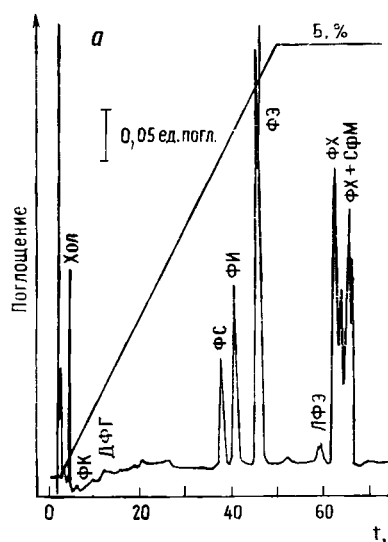


Рис. 7.20. Разделение экстрактов липидов из печени (а) и мозга крысы (б) [102].

Предколонка: 4 см, заполненная видаком; неподвижная фаза в основной колонке: микропак SI-5; элюент: гексан/изопропанол/ H_2O/H_2SO_4 (А — 97:3:0:0,02 и Б — 75:24:0,9:0), градиентное элюирование до 100% Б; объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: при 205 нм.

Хол — холестерин; СФМ — сфингомиелин.

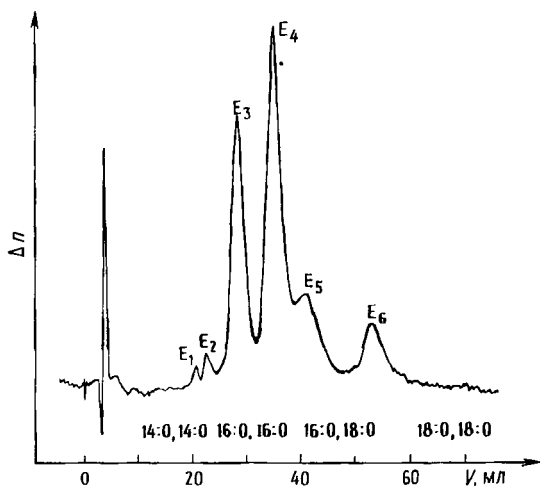


Рис. 7.21. Разделение предварительно очищенного коммерческого препарата «молекулярных видов» лецитина яичного желтка [104].

Неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} ; элюент: $CH_3OH/H_2O/хлороформ$ (100 : 10 : 1); детектор: рефрактометрический.

$E_1 + E_2$ — окисленные продукты с «эффективным углеродным числом» около 29; E_3 — 1-16 : 0-2-18 : 2; E_4 — 1-16 : 0-2-18 : 1; E_5 — 1-18 : 0-2-18 : 2; E_6 — 1-18 : 0-2-18 : 1.

кислот или других ионных модификаторов [79, 102]. Пример оптимизации условий разделения смеси природных фосфолипидов, полученных экстракцией из мозга и печени крысы, приведен на рис. 7.20. По-видимому, разделение всех «молекулярных видов» фосфолипидов в рамках одного хроматографического цикла невозможно. Авторы работы [103] попытались разделить по «молекулярным видам» фосфолипиды яичного желтка на восьми последовательно расположенных колонках длиной 1 м каждая, заполненных биосилом НА. Однако добиться полного разделения смеси на «молекулярные виды» им не удалось. Следует тем не менее отметить, что смесь синтетических препаратов фосфатидилхолина была разделена на двух соединенных вместе колонках, заполненных соответственно бондапаком C_{18} и неподвижной фазой на основе жирной кислоты (Fatty Acid-column фирмы Waters). Элюирование осуществлялось в изократическом режиме смесью метанола, воды и хлороформа [104]. Время удерживания увеличивалось в соответствии с «эффективным углеродным числом», которое по определению авторов работы [104] представляет собой разность между числом ацильных атомов углерода и двойных связей. Пример разделения лецитинов яичного желтка приведен на рис. 7.21.

Надежное обнаружение фосфолипидов при помощи рефрактометрического детектора возможно лишь при их концентрации выше 500 нмоль/л. Авторы работы [105] проводили обнаружение фосфатидилхолинов по поглощению в УФ-области (при 203 нм) после их разделения на обращенной фазе нуклеосил-5-С-18 при элюировании смесью метанол/фосфатный буфер, рН 7,4 (9,5 : 0,5). Определение жирнокислотного состава собранных

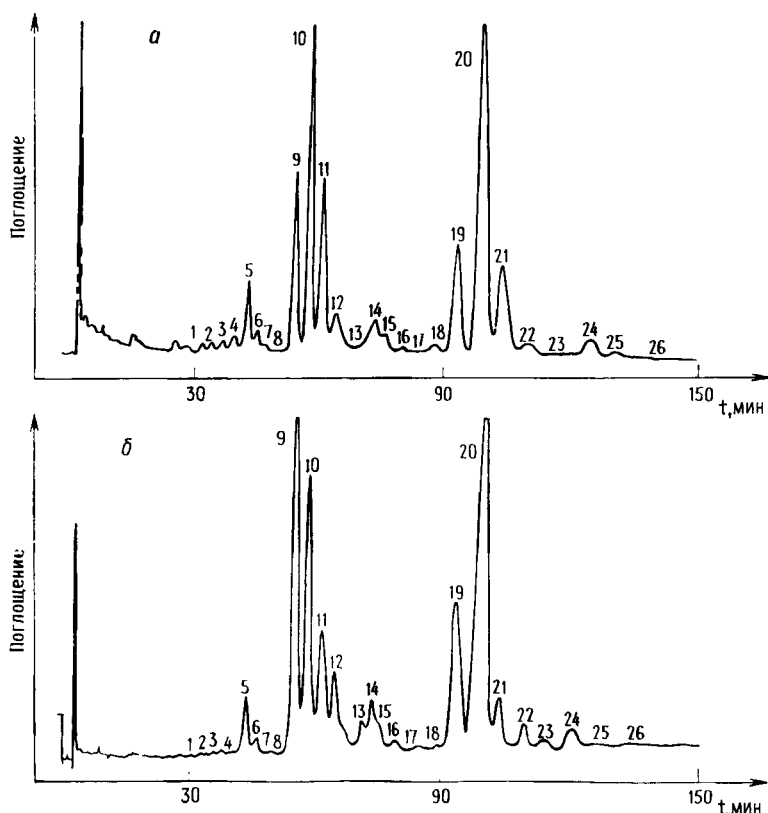


Рис. 7.22. Разделение «молекулярных видов» фосфатидилхолинов (а) и фосфатидилэтаноламинов (б) из печени крысы [106].

Неподвижная фаза: ультрасфер ODS; элюент: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{ацетонитрил}$ (90,5 : 7 : 2,5) + +20 ммоль/л холинхлорида; объемная скорость: 2,0 мл/мин; обнаружение: при 205 нм. 1 — (14 : 0/22 : 6); 2 — (18 : 2/18 : 3+14 : 0/20 : 4); 3 — (16 : 1/18 : 2); 4 — (18 : 2/22 : 6+15 : 0/22 : 6); 5 — (16 : 0/20 : 5+18 : 2/20 : 4); 6 — (18 : 2/18 : 2); 7 — (16 : 0/16 : 1); 8 — (16 : 1/18 : 1); 9 — (16 : 0/22 : 6); 10 — (16 : 0/20 : 4); 11 — (16 : 0/18 : 2); 12 — (18 : 1/18 : 2); 13 — (16 : 0/22 : 5п-3); 14 — (16 : 0/22 : 5п-6+18 : 0/20 : 5); 15 — (16 : 0/20 : 3п-6); 16 — (17 : 0/18 : 2+16 : 0/20 : 3п-9); 17 — (16 : 0/18 : 1); 18 — (18 : 1/18 : 1); 19 — (18 : 0/22 : 6); 20 — (18 : 0/20 : 4); 21 — (18 : 0/18 : 2); 22 — (18 : 0/17 : 1+17 : 0/18 : 1); 23 — (18 : 0/22 : 5п-3); 24 — (18 : 0/22 : 5п-6); 25 — (18 : 0/20 : 3п-6); 26 — (18 : 0/18 : 1); 27 — (20 : 0/22 : 6); 28 — (20 : 0/20 : 4).

фракций показало, что между $\log t_R$ и числом атомов углерода существует линейная зависимость. Кроме того, как выяснилось, существует также взаимосвязь между «гидрофобным углеродным числом» (ГУЧ) — суммарным числом атомов углерода и двойных связей и временем удерживания. Так, например, время удерживания ФХ-ди-18:1 отличается от такового для ФХ-18:0/18:2, поскольку ГУЧ этих соединений различно. Пример разделения «молекулярных видов» ряда природных фосфолипидов приведен на рис. 7.22 [106].

Разделение проводилось последовательно на колонках с лихросорбом SI-100 и ультрасфером ODS, на последней колонке в соответствии с «молекулярным видом» соединений. Двадцать два из двадцати восьми идентифицированных пиков соответствуют индивидуальным «молекулярным видам», а шесть — смеси двух «молекулярных видов».

Применение неподвижных фаз, пропитанных нитратом серебра, которые в настоящее время выпускает ряд фирм, вероятно, позволит добиться более полного разделения «молекулярных видов». В работе [107] описано разделение сфингомиелина и цереброзида на колонках с обращенной неподвижной фазой и неподвижной фазой, пропитанной нитратом серебра (см. рис. 7.24).

7.5.2. Гликолипиды

Гликолипиды делятся на два класса: к первому относятся гликолипиды, в состав которых входит остаток сфингозина, ко второму — имеющие в своем составе остаток глицерина. В состав гликолипидов входят также остатки жирных кислот и сахаров. Липополисахариды бактерий по определению не относятся к гликолипидам, поскольку растворимы в воде. Следует заметить, что некоторые фосфолипиды, например глюкозаминофосфатидилглицерид, также содержат сахарные остатки и что разделить их при помощи ВЭЖХ пока не удалось. Сфингозиновые производные гликолипидов подразделяются на церамиды и ганглиозиды (определение дано ниже), и те и другие входят в состав животных тканей. Церамиды обнаружены также в высших растениях и некоторых (очень немногих) микроорганизмах. Глицериды — это основные компоненты растительных тканей и микроорганизмов, а в животных тканях они содержатся лишь в небольших количествах. При разделении и идентификации гликолипидов перед исследователем встают те же проблемы, что и при разделении фосфолипидов. Поэтому гликолипиды чаще всего хроматографируют в виде бензоильных производных, которые характеризуются заметным поглощением при 230 нм.

7.5.2.1. Церамиды и ганглиозиды. Многие авторы дают соединениям этого класса свои собственные названия, что приводит к путанице, поэтому кратко остановимся вначале на классификации этих соединений.

N-Ацилсфингозин, называемый церамидом, представляет собой «каркас» гликозилцерамидов, которые могут содержать один или более различных сахарных остатков. Галактозилцерамид (Cer-gal) первоначально назывался цереброзидом. Прежнее тривиальное название дигликозилцерамидов (Cer-glc-gal, Cer-gal-gal) — цитозид. Тетрагликозилцерамид (Cer-glc-gal-gal-N-acyl galactosamin) назывался глобозид. В литературе по

ВЭЖХ многие авторы классифицируют церамиды в соответствии с наличием входящих в их состав жирных кислот гидроксигрупп (HFA-Cer или NFA-Cer).

Ганглиозиды содержат одну или более молекул сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты, связанных с церамидными сахарными остатками. Наибольшее распространение в ВЭЖХ получила номенклатура, предложенная Свеннерхольмом (см. подпись к рис. 7.25).

Получение производных и их количественное обнаружение. Авторы работ [108, 109] изучили методы получения производных некоторых гликолипидов и рекомендовали в качестве стандартного следующий способ. Высушенные гликолипиды обрабатывают бензоилхлоридом (10%-ный раствор в пиридине, меньшая концентрация приводит к снижению выхода) при 60°C. Для получения с количественным выходом NFA-Cer достаточно 30 мин, а для получения HFA-Cer — всего 15 мин. Полученные производные экстрагируют гексаном, после чего их необходимо несколько раз промыть 95%-ным метанолом. Следует отметить, что при такой обработке наряду с О-ацилированием происходит и N-амидацилирование. Обработка гликолипидов бензойным ангидридом завершается селективным О-ацилированием, однако ее необходимо проводить при 110°C в течение 16 ч. При такой температуре цереброзиды могут вступать в побочные реакции, поэтому смесь гликозилцереброзидов рекомендуют выдерживать в течение 16 ч при 37°C с бензоилхлоридом [110]. Обнаружение бензоилированных липидов проводят при помощи УФ-детектора (230 нм) и устанавливают их концентрацию по градуировочной кривой, полученной с использованием стандартных проб бензоилированных Cer-glc или Cer-lac. При 100%-ном бензоилировании число бензоильных групп в первом соединении должно равняться шести, во втором — девяти, а в Cer-gal-lac — двенадцати. Коэффициенты поглощения других гликозилцерамидов можно оценить, исходя из предположения об аддитивности поглощения, т. е. поглощение возрастает с увеличением числа бензоильных групп, и принимая, что О- и N-бензоильные группы имеют одинаковые коэффициенты поглощения. Выход после получения производных и разделения при помощи ВЭЖХ составляет 77—90% (по данным, полученным с использованием меченных ¹⁴C церамидов). Предел обнаружения равен 70 пмоль. Авторы работы [111] разделили 6 гликозилцерамидов в виде О-ацетил-N-*n*-нитробензоильных производных с выходом 75% (рис. 7.23). Как выяснилось, выход гликозилцерамидов из эритроцитов человека в значительной степени зависит от метода получения их производных, что свидетельствует о настоящей необходимости совершенствования этих методов.

Условия разделения. HFA-Cer можно отделить от NFA-Cer на колонке с зипаксом (50 см) элюированием 7%-ным этила-

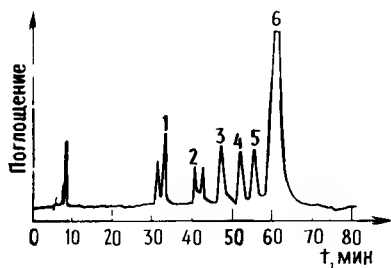


Рис. 7.23. Разделение О-ацетил-N-нитробензонилгликолипидов [111].

Неподвижная фаза: зорбакс SIL; элюент: гексан/дихлорэтан (2 : 1) + 1% изопропанола, градиентное элюирование от 1 до 5% изопропанола, 5 мин; объемная скорость: 0,5 мл/мин; обнаружение: при 254 нм.

1 — глюкозилцерамид; 2 — лактозилцерамид; 3 — лактотриаозилцерамид; 4 — глоботриаозилцерамид; 5 — неолактотетраозилцерамид; 6 — глоботетраозилцерамид.

цетатом в гексане, а последующее разделение NFA-Cer-glc и NFA-Cer-gal можно провести на колонке, заполненной микропаком-NH₂-10, используя в качестве элюента 1,2%-ный раствор пропанола в циклобутане [109]. Если вместо этилацетата применяют диоксан, обнаружение осуществляют при 230 нм, что в 14 раз увеличивает чувствительность по сравнению с обнаружением при 280 нм. Градиентное элюирование вызывает сильный дрейф нулевой линии, и чтобы избежать его, авторы работы [112] рекомендуют создавать в ячейке сравнения такой же градиент, как и в рабочей. В этом случае разделение и обнаружение липидов разных классов можно осуществлять без предварительной очистки пробы; достигаемый предел обнаружения равен 10 пмоль. В работе [113] предложен другой, более удачный вариант анализа Cer-glc, Cer-lac, три- и тетрагликозил-Cer (глобозидов) и N-ацетилсфингозина. Авторы этой работы проводили разделение на колонке с зипаксом при градиентном элюировании смесью диоксана (1—20%, линейный градиент) и гексана. Предел обнаружения Cer-glc и тетраглобозида составил соответственно 2 и 20 пмоль. Нитробензоилпроизводные можно разделять на колонке с зорбаксом SIL при градиентном элюировании 1→5% изопропанолом в смеси гексан/дихлорэтан (2 : 1). Обнаружение осуществлялось при 254 нм [111].

Для разделения «молекулярных видов» липидов полезно объединять колонки, заполненные неподвижной фазой, содержащей ионы серебра, и обращенной фазой [107]. Насыщенные и моноеновые NFA-Cer можно сначала разделить на колонке с хромопаком, пропитанным нитратом серебра, элюируя смесью гексан/изопропанол (9 : 1), а затем провести разделение полученных фракций на «молекулярные виды» на нуклеосиле C₁₈ элюированием чистым метанолом (рис. 7.24). С помощью этого метода были разделены также немодифицированные NFA-Cer (обнаружение при 203 нм).

Как показали авторы работы [114], для обнаружения немодифицированных гликозилцерамидов и ганглиозидов целесообразно использовать пламенно-ионизационный детектор с подвижной проволокой [114]. Разделение эти авторы проводили на

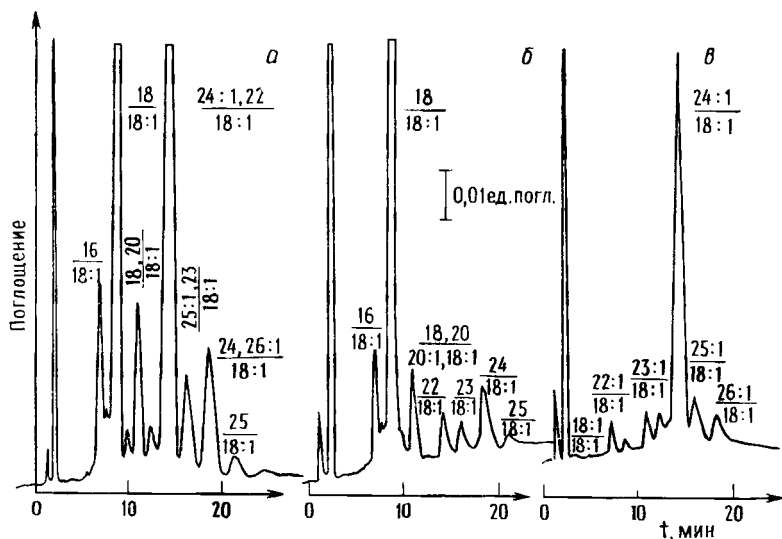


Рис. 7.24. Разделение 3-О-бензоилированных NFA-церамидов из мозга коровы [107].

a — предварительное разделение NFA-Cer на две основные фракции. Неподвижная фаза: хромopak, пропитанный раствором серебра; элюент: гексан/изопропанол (9:1); объемная скорость: 0,5 мл/мин; *б*, *в* — хроматограммы фракций, полученных после предварительного разделения.

Неподвижная фаза: иукеосил-5 C₁₈; элюент: CH₃OH; объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: при 230 нм.

Фракция 1 (*б*) — насыщенные и моноеновые жирнокислотные производные; фракция 2 (*в*) — ненасыщенные жирнокислотные производные с двумя двойными связями.

колонке с SI-60, оптимальным элюентом для разделения гликозилцерамидов оказалась смесь хлороформ/метанол, а для ганглиозидов — смесь хлороформ/метанол/водный раствор HCl (рис. 7.25). Влияние фосфолипидов можно элиминировать с помощью гидролиза NaOH (гликосфингозины при этом не гидролизуются).

7.5.2.2. Гликозилглицериды. Соединения этого класса галактозилглицериды — основные компоненты мембран хлоропластов высших растений и водорослей, сульфохиновозилдиглицерид (растительный суфолипид) обнаружен во всех фотосинтезирующих видах растений, а маннозилдиглицериды содержатся в значительных количествах в бактериях. В литературе тем не менее описано сравнительно мало примеров разделения этих гликозилглицеридов при помощи ВЭЖХ. Галактолипиды вместе с липидами других классов (разд. 7.4.1 и рис. 7.14) были разделены на колонке с порасилом II [77], а также на колонке со сферисорбом ODS [115], обнаружение осуществлялось с помощью рефрактометрического или пламенно-ионизационного

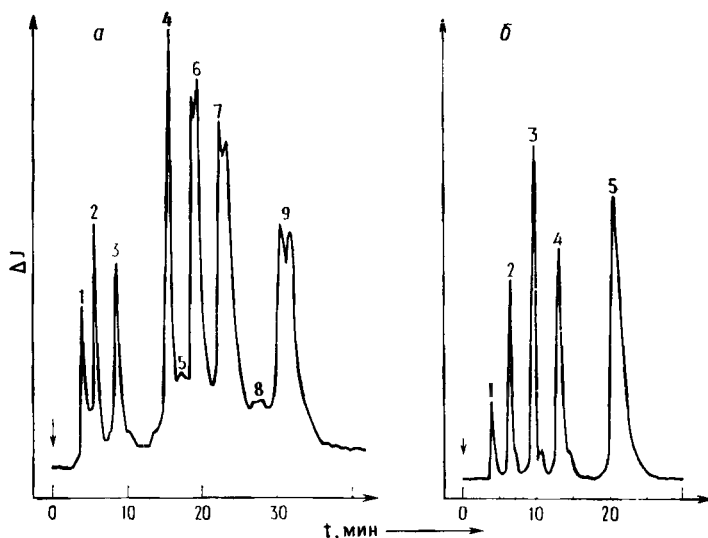


Рис. 7.25. Разделение стандартных смесей ганглиозид- (а) и гликофинголипидов (б) мозга быка [114].

Неподвижная фаза: лихросорб SI-60 (9 мкм); элюент: хлороформ/метанол/0,01 М НСl (60 : 35 : 4); детектор ПИД с подвижной проволокой.

а: 1, 5, 8 — неидентифицированы, 2 — Cer-glc-gal-sialo, 3 — Cer-glc-galsialo-galNAc, 4 — Cer-glc-galsialo-galNAc-gal, 6 — Cer-glc-galsialo-galNAc-galsialo, 7 — Cer-glc-gal-disialo-galNAc-gal, 9 — Cer-glc-gal-disialo-galNAc-galsialo.
б: 1 — неидентифицирован, 2 — Cer-glc, 3 — Cer-lac, 4 — Cer-dl-gal-glc, 5 — Cer-glc-gal-galNAc-galN.

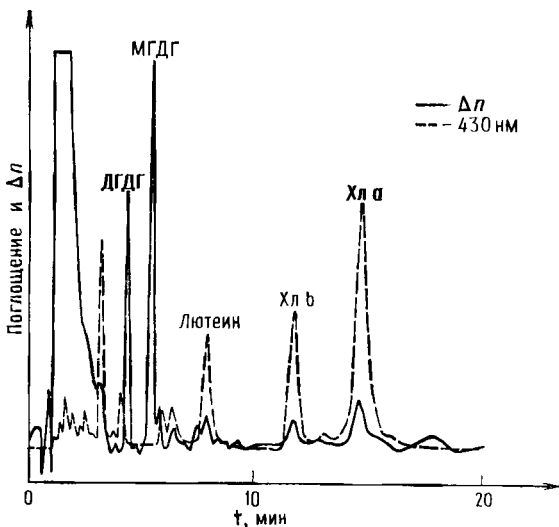


Рис. 7.26. Разделение экстракта липидов из зеленых листьев кукурузы (Иванчик, 1980 г., неопубликованные данные).

Неподвижная фаза: лихросорб RP-8 (5 мкм); элюент: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (9 : 1); объемная скорость: 2 мл/мин; температура: 40 °С; обнаружение: рефрактометрическое и спектрофотометрическое при 430 нм (параллельное).

детектора. В лаборатории авторов данной главы содержащиеся в растительных экстрактах галактолипиды были непосредственно разделены на колонке с лихросорб RP-8 (обращенная фаза, 25 см), элюентом служила смесь метанол/вода (9:1). Обнаружение проводилось параллельно УФ- и рефрактометрическим детекторами. На рис. 7.26 приведена хроматограмма экстракта растительных липидов. Обнаружение галактолипидов проводили рефрактометрически, а обнаружение пигментов, осуществляемое параллельно, — спектрофотометром при 430 нм, сигнал с которого выводился на второй самописец. Обнаружение пигментов можно вести и при 208 нм ввиду высокого содержания в них ди- и триеновых жирнокислотных остатков (линолевой и линоленовой кислот). Как

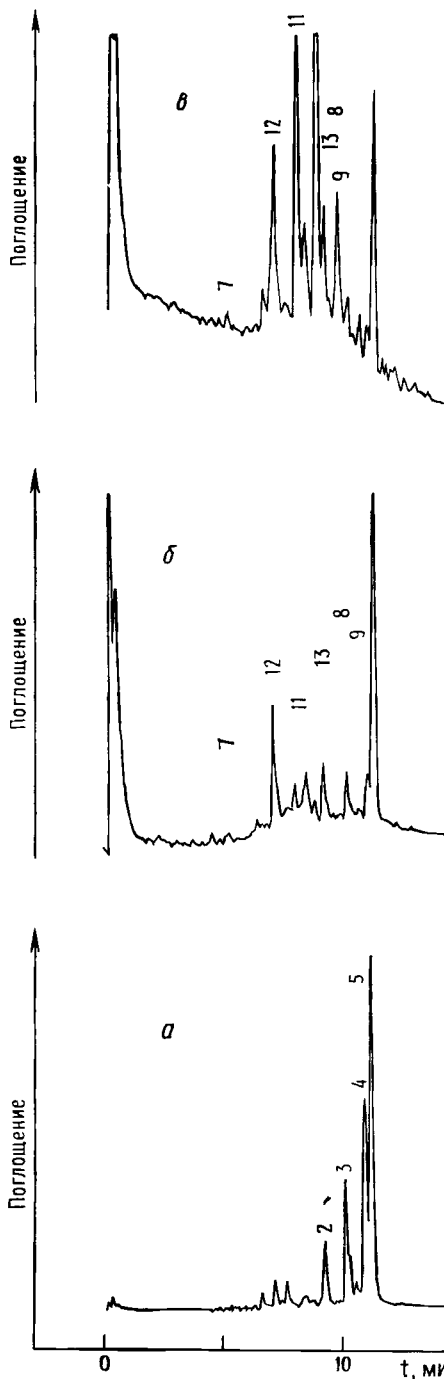


Рис. 7.27. Разделение экстракта липидов из зеленых листьев салата [11].

Колонка: 5 см; неподвижная фаза: лихросорб RP-2 (5 мкм); элюент: ацетонитрил/Н₂O (19:1) с добавлением 0,01 М фосфатного буфера до pH 7,7; объемная скорость: 2,0 мл/мин; температура колонки: 40 °С; обнаружение: при 430 (а), 224 (б) и 204 нм (в). 2, 3 — каротиноиды; 4, 5 — хлорофиллы; 7 — ФИ+ФГ; 8 — ФЭ; 9 — ФХ-дн-18-0; 11 — МГДТ; 12, 13 — ДГДТ.

показали авторы работы [11], изучавшие разделение растительных тканей, содержащих и не содержащих хлорофилл, каротиноиды и хлорофиллы не мешают обнаружению гликозилглицеридов. При высоком содержании пигментов целесообразно использовать рефрактометрический детектор, поскольку коэффициент преломления пигментов невелик. Однако чувствительность рефрактометрического обнаружения галактолипидов примерно в четыре раза меньше, чем при обнаружении УФ-детектором (при 208 нм). Диапазон линейности сигнала УФ-детектора соответствует 0,2—200 мкг галактолипидов в анализируемой пробе. Чувствительность обнаружения (при 206 нм) повышается при замене в элюентной смеси метанола на ацетонитрил. Результаты количественного анализа липидов при помощи ТСХ и ВЭЖХ хорошо согласуются. Рис. 7.27 позволяет сравнить эффективность обнаружения растительных липидов при длинах волн 430, 224 и 204 нм после их разделения на колонке с обращенной фазой RP-2 (50×4,6 мм внутр. диаметр, 5 мкм).

7.6. Углеводороды, спирты, воски, производные терпеноидов

Природные воски состоят из спиртов, углеводов и сложных эфиров. Эти соединения обычно входят в состав кутикулы растений и животных и участвуют в удерживании в организме воды. Воски также служат защитным барьером против внешних воздействий. Состав восков может быть самым разным и, по-видимому, зависит от того, какую функцию выполняет та или иная поверхность. Например, содержание углеводов в восках насекомых составляет около 50%, тогда как в животных восках обычно не достигает и 1%. Углеводороды — основные компоненты нефти и природного газа — разделяют на олефины, парафины и многие другие компоненты. Анализ этих соединений главным образом проводят при помощи ГХ, ВЭЖХ не получила широкого распространения.

В данном разделе мы рассмотрим разделение при помощи ВЭЖХ некоторых фитогормонов, синтезированных по терпеноидному пути, и ряда эфирных масел.

7.6.1. Углеводороды и липофильные спирты

Фракционирование углеводов, альдегидов, кетонов и три-терпенов для последующего газохроматографического разделения осуществляют на 1,4-метровой колонке с силикагелем при элюировании смесью гексан/этилацетат [116]. В разд. 7.4 уже отмечалось, что углеводороды отделяют от глицеридов на колонке с неподвижной фазой SI-60 [3]. На этой же колонке было

проведено разделение технических олефинов при элюировании изооктаном и обнаружении при помощи рефрактометрического детектора [117—119]. Для разделения сложных смесей многоядерных ароматических углеводородов широко применяют колонки с обращенными фазами, например зорбаксом ODS и лихросорбом RP-18 [120], а также видаком 201 TP [121]. Лучший элюент — это смесь ацетонитрил/вода. Время удерживания увеличивается с увеличением отношения длины молекулы к ее ширине. Для обнаружения пригодны рефрактометрический, УФ- и флуоресцентный детекторы [122]. Жирные спирты с длинной углеводородной цепью (C_{49} — C_{58}) разделяют в виде их динитробензоиловых эфиров [123]. Предварительное отделение насыщенных спиртов от ненасыщенных проводят с помощью ТСХ на неподвижных фазах, содержащих ионы серебра. После этого насыщенные спирты разделяют на колонке с радиалпаком C-18 (10 см), а ненасыщенные — на колонке с микропаком MCHC-18 (30 см) при элюировании смесью диоксан/ацетонитрил (3:2 и 3:13 соответственно).

7.6.2. Воски, эфирные масла, терпеноидные растительные гормоны

Воски — это сложные эфиры спиртов с длинной углеродной цепью (10—30 атомов углерода) и длинноцепочечных жирных кислот. Они образуют покрытие поверхности многих организмов и подробно описаны в литературе [124, 125]. Данные по разделению этих соединений при помощи ВЭЖХ крайне ограничены, что, по-видимому, объясняется чрезвычайной сложностью их идентификации, обусловленной отсутствием соответствующих стандартов. Идентификацию, как правило, осуществляют физическими методами, например методом масс-спектрометрии. Содержащиеся в масле хохобы (*Apache Jojoba*) эфиры были разделены в соответствии с длиной их углеводородной цепи на двух последовательно соединенных колонках (длиной по 30 см каждая), заполненных неподвижной фазой бондапак C_{18} . Элюирование проводилось смесью ацетонитрил/вода (2:1), а обнаружение — при помощи рефрактометрического детектора (рис. 7.28). Химический анализ пяти выделенных при этом фракций показал, что это эфиры жирных кислот и спиртов, в углеродной цепи которых содержится от 36 до 46 атомов углерода [126].

На такой же колонке авторы работы [127] провели разделение ряда эфирных масел. Элюентом служила смесь метанол/вода (2:1), обнаружение осуществлялось УФ-детектором (при 254 нм). Большинство из 20 выделенных веществ идентифицировано не было.

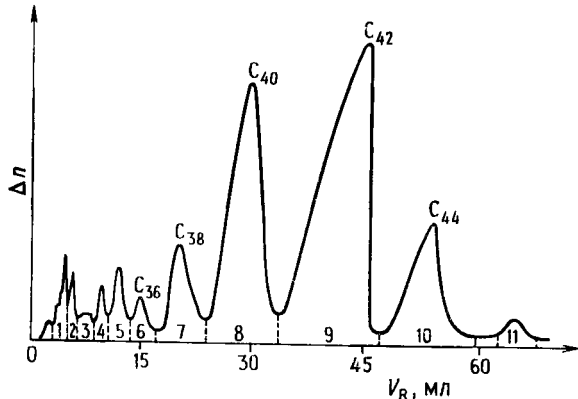


Рис. 7.28. Разделение масла хохобы (*Arache Jojoba*) [126].

Колонки: две последовательно соединенные колонки длиной 80 см каждая; неподвижная фаза: бондапак C_{18} ; элюент: ацетонитрил/ацетон (2 : 1); обнаружение: рефрактометрическое.

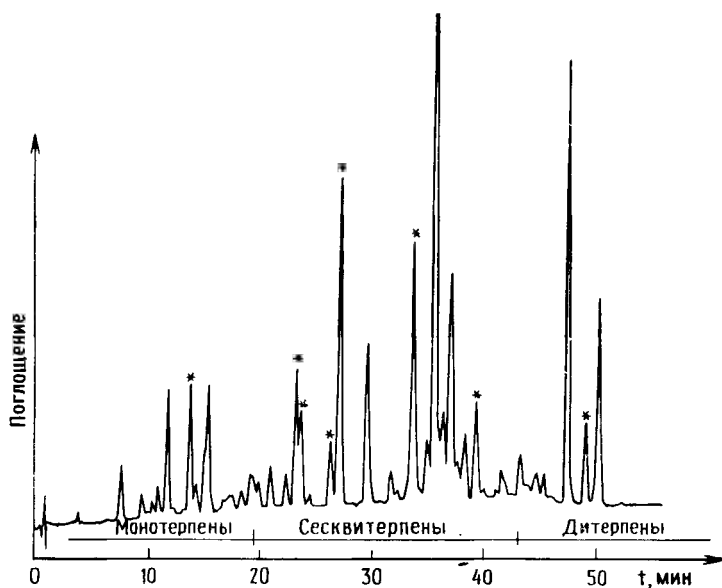


Рис. 7.29. Разделение фракций масла из *Cistus ladanifer*, элюируемых пента-ном [128].

Неподвижная фаза: лихросорб RP-18 (5 мкм); элюент: ацетонитрил/ H_2O (1 : 1), градиентное элюирование до 100% ацетонитрила 45 мин; обнаружение: при 220 нм (отмеченные звездочками пики можно обнаруживать и при 240 нм). Большинство пиков идентифицировано.

Моно-, сескви- и дитерпены и лактоны сесквитерпеноидов можно разделить за один хроматографический цикл на колонках с обращенной фазой (RP-8 или RP-18) при градиентном элюировании смесью ацетонитрил/вода (50%→100%) в течение 60 мин (рис. 7.29) [128, 129]. Максимумы поглощения некоторых терпеноидов соответствуют различным длинам волны, что позволяет осуществить их обнаружение на детекторах со сменной длиной волны (200—254 нм). Предел обнаружения составляет 5 мкг, диапазон линейности — до 20 мкг.

В работе [130] описано разделение изомеров фарнезола на колонке с порасилом (30 см) при элюировании смесью триметилпентана и этилового эфира (9:1) после предварительного обогащения пробы. Авторы работы [131] предложили метод разделения природных восков на углеводороды, метиловые эфиры жирных кислот, моно-, ди- и триглицериды, альдегиды и кетоны и их количественного определения. Для разделения используются две колонки, соединенные друг с другом (каждая длиной 20 см), заполненные сферисорбом SSW (5 мкм). Элюирование ведется смесями различного состава на основе гексана, ТГФ, изопропанола и ацетонитрила. Углеводороды элюируются первыми (изократический режим, гексан) и обнаруживаются рефрактометрически. Остальные компоненты обнаруживают ИК-детектором по поглощению карбонильных групп (при 5,75 мкм), так как поглощение гидроксильных групп при 3,3 мкм незначительно. Жирные кислоты перед разделением рекомендуются переводить в их метиловые эфиры. Достигнутый предел обнаружения равен 1,2 мкг.

К терпеноидам относятся два регулятора роста растений — абсцизовая (АК) и гибберелловая (ГК) кислоты, поглощающие в УФ-области спектра. Гибберелловая кислота принадлежит к группе из более чем 50 гиббереллинов, имеющих общий гиббановый скелет и различные заместители. Как и другие фитогормоны, АК и ГК привлекают внимание исследователей вследствие своей биологической активности. Содержание этих и других фитогормонов в тканях растений крайне невелико. Например, 10 000 ячменных coleoptiles содержит всего 1 мкг гибберелловой кислоты. Поэтому необходимо проводить предварительную очистку и обогащение проб, подвергаемых разделению с помощью ВЭЖХ. Как для очистки, так и для разделения используют колонки с обращенными фазами [132—139, 152]. Абсцизовую кислоту обнаруживают по поглощению при 254 или 280 нм, гибберелловую — в области 200—208 нм. Гиббереллины, разделяемые на колонках с нормальной фазой, обнаруживают в виде *n*-нитробензоильных эфиров при 256 нм [140, 141]. Обнаружение гиббереллинов, меченных ^3H или ^{14}C , проводилось при помощи сцинтилляционного счетчика с проточной ячейкой [142, 143]. На рис. 7.30 показаны разделение абсцизовой, фазеиновой и

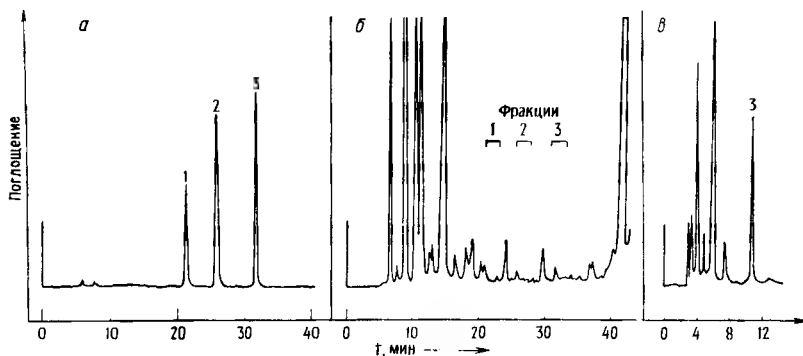


Рис. 7.30. Разделение смеси растительных гормонов (а), экстрактов из листьев сорго (б) и трех выделенных из этого экстракта фракций (в) [152].

а, б — колонка: 25 см; неподвижная фаза: ультрасфер ODS, элюент: $H_2O/CH_3OH/уксусная кислота$, градиентное элюирование от 60 : 40 : 0,5 до 30 : 70 : 0,5; объемная скорость: 1,6 мл/мин; обнаружение: при 254 нм.

в — неподвижная фаза: ультрасфер SI; элюент: хлороформ/ацетонитрил/уксусная кислота (94 : 5 : 1); объемная скорость: 1 мл/мин.

1 — фазенновая кислота; 2 — индолилуксусная кислота; 3 — абсцисовая кислота.

индолилуксусной кислот, содержащихся в экстрактах листьев сорго, и последующая их очистка на колонке с обращенной фазой. Предел обнаружения составил 1 мкг, выход 75%.

Современные методы анализа растительных гормонов, включая ВЭЖХ, рассмотрены в обзоре [153].

Литература

1. Zhukov A. V., Vereshchagin A. G. *Adv. Lipid Res.*, **18**, 247—282 (1981).
2. Stolyhwo A., Privett O. S. *J. Chromatogr. Sci.*, **11**, 20—25 (1973).
3. Aitzetmüller K., Koch J. *J. Chromatogr.*, **145**, 195—202 (1978).
4. Tevini M., Iwanzik W., Thoma U. *Planta*, **153**, 388—394 (1981).
5. Eskins K., Scholfield C. R., Dutton H. J. *J. Chromatogr.*, **135**, 217—220 (1977).
6. Shoaf W. T. *J. Chromatogr.*, **152**, 247—249 (1978).
7. Stransky H. Z. *Naturforsch.*, **33**, 836—840 (1978).
8. Braumann T., Grimme L. H. *J. Chromatogr.*, **170**, 264—268 (1979).
9. Braumann T., Grimme L. H. *Biochem. Biophys. Acta*, **637**, 8—17 (1981).
10. Davies D., Holdsworth E. S. J. *Liqu. Chromatogr.*, **3** (1), 123—132 (1980).
11. Riedmann M., Tevini M. *Hewlett-Packard Application Note*, 232/13, 1980.
12. Eskins K., Harris L. *Photochem. Photobiol.*, **33**, 131—133 (1981).
13. Iriyama K., Yoshiura M., Shiraki M. *J. Chromatogr.*, **154**, 302—305 (1978).
14. Yoshiura M., Iriyama K., Shiraki M. *Chem. Lett.*, **6**, 281—282 (1978).
15. Iriyama K., Shiraki M. *J. Liqu. Chromatogr.*, **2** (2), 255—276 (1979).
16. Prenzel U., Lichtenthaler H. K., in: Liljenberg C., Appelqvist L.-A. (Eds.): *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*. Elsevier Biomedical Press, 1979.
17. Williams R. C., Schmidt J. A., Henry R. A. *J. Chromatogr. Sci.*, **10**, 494 (1972).
18. Cavins J. F., Inglett G. E. *Am. Ass. Cereal Chem.*, **51**, 605—609 (1974).
19. Tiebach R. K. D., Schramm M. *Chromatographia*, **13** (7), 403—407 (1980).

20. Rao G. H. R., Krick T. P., White J. G. J. *Chromatogr.*, 196, 506—511 (1980).
21. Howell S. K., Wang Y.-W. J. *Chromatogr.*, 227, 174—180 (1982).
22. McMurry C. H., Blanchflower W. J. J. *Chromatogr.*, 178, 525—531 (1979).
23. Tangney C. C., Driskell J. A., McNair H. M. J. *Chromatogr.*, 172, 513—515 (1979).
24. Thompson J. N., Hatina G. J. *Liq. Chromatogr.*, 2 (3), 327—344 (1979).
25. Lichtenthaler H. K., Prenzel U. J. *Chromatogr.*, 135, 493—498 (1977).
26. Lichtenthaler H. K., Prenzel U. ISF/AOSC World Congress, New York, 1980.
27. Abe K., Hiroshima O., Ikenoya S., Ohmae M., Kawabe K. ISF/AOCS World Congress, NY, 1980.
28. Lominski A., Rienits K. G. *Phytochemistry*, 20 (5), 993—996 (1981).
29. Strain H. H., Mannig W. M. J. *Biol. Chem.*, 146, 275 (1942).
30. Strain H. H. J. *Agr. Food Chem.*, 1222—1225 (1954).
31. Bacon M. F., Holden M. *Phytochemistry*, 6, 193—210 (1967).
32. Puglisi C. V., de Silva J. A. F. J. *Chromatogr.*, 120, 457—464 (1976).
33. Puglisi C. V., de Silva J. A. F. J. *Chromatogr.*, 152, 424—430 (1978).
34. Paanacker J. E., Groenendijk G. W. T. J. *Chromatogr.*, 168, 125—132 (1979).
35. Besner J.-G., Leclair R., Band P. R. J. *Chromatogr.*, 183, 346—351 (1980).
36. Frolic C.-A., Tavel T. E., Peck G. L., Sporn M. B. *Anal. Biochem.*, 86, 743—750 (1978).
37. Palmiskog G. J. *Chromatogr.*, 221, 345—351 (1980).
38. Wang C.-C., Campbell S., Furner R. L., Hill D. L. *Drug Metab. Disper.*, 8, 8 (1980).
39. Vane F. M., Stollenberg J. K., Bugge J. L. J. *Chromatogr.*, 227, 471—484 (1982).
40. Kuksis A., in: Kuksis A. (Ed.): *Handbook of Lipid Research*, vol. 1, pp. 1—122. Plenum press, New York, 1978.
41. Lie Ken Jie M., in: Giddings J. C., Gushka E., Keller R. A., Cazes J. (Eds.): *Advances in Chromatography*, vol. 18, pp. 1—57, Marcel Dekker, New York, 1979.
42. Scholfield C. R. *Anal. Chem.*, 47 (8), 1417—1420 (1975a).
43. Scholfield C. R. *Lipids*, 16, 36—37 (1975b).
44. Plattner R. D., Wade K., Kleiman R. J. *Am. Oil Chem. Soc.*, 54, 511—515 (1977).
45. Henke H., Schubert J. C. J. *High Resol. Chrom. and Chromat. Com.*, 3, 69—78 (1980).
46. Miles F., Schuring V., Gil-Av E. J. *Chromatogr.*, 83, 91 (1973).
47. Battaglia R. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 68, 28 (1977).
48. Mattaglia R., Fröhlich D. *Chromatographia*, 13 (7), 428—431 (1980).
49. Pei P. T.-S., Henly R. S., Ramachandran S. *Lipids*, 10(3), 152—156 (1975).
50. Warthen J. D., Jr. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 52, 151 (1975).
51. Politzer I. R., Griffin G. W., Dowty B. J., Leseter J. L. *Anal. Lett.*, 6, 539 (1973).
52. Cooper M. J., Anders M. W. *Anal. Chem.*, 46, 1849 (1974).
53. Knapp D. R., Krüger S. *Anal. Lett.*, 8, 603 (1975).
54. Regis Lab. Notes, 16 (1974).
55. Borch R. F. *Anal. Chem.*, 47 (14), 2437—2439 (1975).
56. Durst H. D. *Tetrahedron Lett.*, 2421 (1974).
57. Durst H. D., Milano M., Kikta E. J. Jr., Connelly S. A., Grushka E. *Anal. Chem.*, 47 (11), 1797—1801 (1975).
58. Pei P. T.-S., Kossa W. C., Ramachandran S., Henly R. S. *Lipids*, 11, 814 (1976).
59. Miller R. A., Bussell N. E., Ricketts C. J. *Liqu. Chromatogr.*, 1(3), 291—304 (1978).

60. *Jordi H. C. J. Lique. Chromatogr.*, **1** (2), 215—230 (1978).
61. *Takayama K., Jordi H. C., Benson F. J. Lique. Chromatogr.*, **3** (1), 61—69 (1980).
62. *Bussell N. E., Miller R. A. J. Lique. Chromatogr.*, **2** (5), 697—718 (1979).
63. *Smith W. L., Lands W. E. M. J. Biol. Chem.*, **247**, 1038—1047 (1972).
64. *Galliard T., Chan H. W. S.*, in: *Stumpf P. K. (Ed.): Biochemistry of Plants*, vol. 4, pp. 132—162, Academic Press, New York, 1980.
65. *Galliard T.*, in: *Galliard T., Mercer E. J. (Eds.): Recent Advances in Chemistry and Biochemistry of Plant Lipids—Proceedings of the Phytochemical Society*, No. 12, pp. 319—358, Academic Press, New York, 1975.
66. *Chan H. W. S., Prescott F. A. A., Swoboda P. A. T. J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 572—576 (1976).
67. *Chan H. W. S., Levett G. Lipids*, **12** (10), 837—840 (1977).
68. *Aoshima H. Anal. Biochem.*, **87**, 49—55 (1978).
69. *Zelenski S. G., Haber J. W. Chromatographia*, **11** (11), 645—646 (1978).
70. *Bussell N. E., Gross A., Miller R. A. J. Lique. Chromatogr.*, **2** (9), 1337—1365 (1979).
71. *Mell L. D., Joseph S. W., Bussell N. E. J. Lique. Chromatogr.*, **2** (3), 407—416 (1979).
72. *Hullett D. A., Eisenreich S. J. Anal. Chem.*, **51** (12), 1953—1960 (1979).
73. *Tweeten T. N., Wetzel D. L. Cereal Chem.*, **56** (5), 398—402 (1979).
74. *Passi S., Rothshild-Boros M. C., Fasella P., Nazzaro-Porro M., Whitthouse D. J. Lipid. Res.*, **22**, 778—784 (1981).
75. *Roggero J. P., Coen S. V. J. Lique. Chromatogr.*, **4** (10), 1817—1829 (1981).
76. *King J. W., Adams E. C., Bidlingmeyer B. A. J. Lique. Chromatogr.*, **5** (2), 275—304 (1982).
77. *Privett O. S., Dougherty K. A., Erdahl W. L., Stolyhwo A. J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 516 (1973).
78. *Jensen G. W. J. Chromatogr.*, **204**, 407—411 (1981).
79. *Compton B. J., Purdy W. C. J. Lique. Chromatogr.*, **3** (8), 1183—1194 (1980).
80. *Bezdard J. A., Quedraogo M. A. J. Chromatogr.*, **196**, 279—293 (1980).
81. *Plattner R. D., Payne-Wahl J. Lipids*, **14** (2), 152—153 (1979).
82. *Riison T., Hoffmeyer L. J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 649—652 (1978).
83. *Karleskind A., Valmalle G., Midler O., Blanc M. Analysis*, **5** (2), 79—84 (1977).
84. *Parris N. A. J. Chromatogr.*, **149**, 615—624 (1978).
85. *Plattner R. D., Wade K., Kleiman R. J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 381—382 (1977).
86. *Sudrand G., Coustard J. M., Retho C., Hagemann R., Gaudin D., Virelizier H. J. Chromatogr.*, **204**, 397—406 (1981).
87. *Garti N., Aserin A. J. Lique. Chromatogr.*, **4** (7), 1173—1194 (1981).
88. *McCluer R. H., Jungalwala F. B.*, in: *Hawk G. L. (Ed.): Biological/Biomedical Applications of Liquid Chromatography*, pp. 7—30, Marcel Dekker, New York, 1979.
89. *Jungalwala F. B., Turel R. J., Evans J. E., McCluer R. H. Biochem. J.*, **145**, 517—526 (1975).
90. *Batley M., Packer N. H., Redmond J. W. J. Chromatogr.*, **198**, 520—525 (1980).
91. *Blom C. P., Deirekauf F. A., Riemersma J. C. J. Chromatogr.*, **171**, 331—338 (1979).
92. *Uungalwala F. B., Evans J. E., McCluer R. H. Biochem. J.*, **155**, 55—60 (1976).
93. *Chen S. S. H., Kou A. E. J. Chromatogr.*, **227**, 25—31 (1982).
94. *Geurts van Kessel W. S. M., Hax W. M. A., Demel R. A., De Gier J. Biochem. Biophys. Acta*, **486**, 524—530 (1977).

95. Hax W. M. A., Geurts van Kessel W. S. M. J. Chromatogr., **142**, 735—741 (1971).
96. Hanson V. L., Park J. Y., Osborn T. W., Kiral R. M. J. Chromatogr., **205**, 393—400 (1981).
97. Ashworth E. N., John J. B. S., Christiansen M. N., Patterson G. W. J. Agric. Food Chem., 879—881 (1981).
98. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., **234**, 466 (1959).
99. Fiske C. H., Subbarow Y. J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
100. Gross R. W., Sobel B. E. J. Chromatogr., **197**, 79—85 (1980).
101. Briand R. L., Harold S., Blass K. G. J. Chromatogr., **223**, 277—284 (1981).
102. Yandrasitz J. R., Berry G., Segal S. J. Chromatogr., **225**, 319—328 (1981).
103. Fager R. S., Shapiro S., Litman B. J. J. Lipid. Res., **18**, 704—709 (1977).
104. Porter N. A., Wolf R. A., Nixon J. R. Lipids, **14** (1), 20—24 (1978).
105. Smith M., Jungalwala F. B. J. Lipid Res., **22**, 697—704 (1981).
106. Patton G. M., Fasulo J. M., Robins S. J. J. Lipid Res., **23**, 190—196 (1982).
107. Smith M., Monchamp P., Jungalwala F. B. J. Lipid. Res., **22**, 714—719 (1981).
108. McCluer R. H., Evans J. E. J. Lipid. Res., **14**, 611—617 (1973).
109. McCluer R. H., Evans J. E. J. Lipid Res., **17**, 412—418 (1976).
110. Ullman M. D., McCluer R. H. J. Lipid. Res., **18**, 371—378 (1977).
111. Suzuki A., Kundu S. K., Marcus D. M. J. Lipid Res., **21**, 473—477 (1980).
112. Jungalwala F. B., Hayes L., McCluer R. H., J. Lipid. Res., **18**, 285—292 (1977).
113. Ullman M. D., McCluer R. H. J. Lipid. Res., **19**, 910—913 (1978).
114. Tjaden U. R., Krol J. H., van Hoeven R. P., Oomen-Menlemans E. P. M., Emmelot P. J. Chromatogr., **136**, 233—243 (1977).
115. Chung O. K., Tweeten T. N., Wetzel D. L. ISF/AOCS World Congress, New York, 1980.
116. Anderson L. A., Doggett N. S., Ross M. S. F. J. Lipid Chromatogr., **2** (3), 455—461 (1979).
117. Suatoni J. C., Swab R. E. J. Chromatogr. Sci., **13**, 361—366 (1975).
118. Suatoni J. C., Swab R. E. J. Chromatogr. Sci., **14**, 535—537 (1976).
119. Suatoni J. C., Swab R. E. J. Chromatogr. Sci., **18**, 375—377 (1980).
120. Katz E., Ogan K. Chromatogr. Newslett., **8**, 20—22 (1980).
121. Wiese S. A., Bonnett W. J., Guenther F. R., May W. E. J. Chromatogr. Sci., **19**, 457—465 (1981).
122. Nielson T. J. Chromatogr., **170**, 147—156 (1979).
123. Quereshi N., Takayama K., Schoes H. K. J. Lipid Chromatogr., **4** (7), 1207—1218 (1981).
124. Kolattukudy P. E., in: Tevini M., Lichtenthaler H. K. (Eds.): Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants, pp. 272—292, Springer Verlag, Berlin-New York, 1977.
125. Kolattukudy P. E., in: Stumpf P. K., Conn E. E. (Eds.): The Biochemistry of Plants, vol. 4, pp. 571—645, Academic Press, New York, 1980.
126. Spencer G. F., Plattner R. D., Miwa T. J. Am. Oil Chem. Soc., **54**, 187—189 (1977).
127. Komae H., Hayashi N. J. Chromatogr., **114**, 258—260 (1975).
128. Strack D., Proksch P., Gültz P.-G. Z. Naturforsch., **35c**, 675—681 (1980a).
129. Strack D., Proksch P., Gültz P.-G. Z. Naturforsch., **35c**, 915—918 (1980b).
130. Warthen J. D. Jr. J. Lip. Chromatogr., **3** (2), 279—286 (1980).
131. Atkin D. S. J., Hamilton R. J., Mitchell S. F., Sewell P. A. Chromatographia, **15** (2), 97—100 (1982).
132. Dühring H., Bachmann O. Physiol. Plant., **34**, 201—203 (1975).
133. Sweetser P. B., Vatoars A. Anal. Biochem., **71**, 68—78 (1976).
134. Ciha A. J., Brenner M. L., Brun W. A. Plant Physiol., **59**, 821—826 (1977).
135. Arteca R. N., Poovaiak B. W., Smith O. E. Plant Physion., **65**, 1216—1219 (1980).

136. *Dusley R. C., Kannangara T., Simpson G. M. J. Chromatogr., 236, 181—188 (1982).*
137. *Norman S. M., Maier V. P., Echols L. C. J. Liquid Chromatogr., 5 (1), 81—91 (1982).*
138. *Yamaguchi I., Yokota T., Yoshida S., Takahashi N. Phytochemistry, 18, 1699—1702 (1979).*
139. *Jones M. G., Metzger J. D., Zeevaart J. A. D. Plant Physiol., 65, 218—221 (1980).*
140. *Heftmann E., Saunders G. A., Haddon W. F. J. Chromatogr., 156, 71—77 (1978).*
141. *Reeve D. R., Crozier A., in: Hillman J. R. (Ed.): Isolation of Plant Growth Substances, pp. 41—77, Cambridge University Press, 1978.*
142. *Reeve D. R., Yokota T., Nash L. J., Crozier A. J. Exp. Bot., 27, 1243—1258 (1976).*
143. *Reeve D. R., Crozier A. J. Chromatogr., 137, 271 (1977).*
144. *Ansell G. B., in: Form and Function of Phospholipids, B. B. A. Library, vol. 3, pp. 377—422, Elsevier, 1973.*
145. *Prenzel U., Lichtenthaler H. K. J. Chromatogr., 242, 9—19 (1982).*
146. *Bailie A. G., Terry D. W., O'Brien R. K., Beebe J. M., Stuart J. D., McCosh-Lilie E. J., Hill D. W. J. Chromatogr. Sci., 20, 466—470 (1982).*
147. *Schoch S. Z. Naturforsch., 33c, 712—714 (1978).*
148. *Stetner R., Wieschhoff H., Scheer H. J. Chromatogr., 242, 127—134 (1982).*
149. *Aitzetmüller K. J. Chromatogr., 113, 231—266 (1975).*
150. *Stancher B., Zonta F. J. Chromatogr., 238, 217—225 (1982).*
151. *Alam J., Smith J. B., Silver M. J., Ahern D. J. Chromatogr., 234, 218—221 (1982).*
152. *Dusley R. C., Kannangara T., Simpson G. M. J. Chromatogr., 236, 181—188 (1982).*
153. *Horgan R., in: Reinhold L., Harbon J. B., Swain T. (Eds.): Progress in Phytochemistry, vol. 7, pp. 137—170, Pergamon Press, London, 1981.*

Углеводы

Г. Бауэр, В. Вёльтер
(H. Bauer, W. Voelter)

8.1. Введение

Для углеводов характерно необычайно большое число стерео-изомеров (например, существует 32 изомера неразветвленных молекул нейтральных гексоз с одинаковой молекулярной массой) и насыщенность молекул гидроксильными группами, что затрудняет разработку методов их разделения.

Тем не менее в настоящее время хроматографисты располагают различными аналитическими и препаративными методиками разделения и идентификации углеводов. Прежде всего это хроматография на бумаге [1] — именно таким способом были впервые разделены углеводы, на смену ей пришла тонкослойная хроматография [2], далее были разработаны методы, основанные на жидко-твердофазной [3, 5] и жидко-жидкостной [5—7] колоночной хроматографии, ионообменной хроматографии углеводов в виде их эфиров с борной кислотой [8—11], а также газовая хроматография летучих производных углеводов [12, 13].

8.2. Общие методики

8.2.1. Жидко-твердофазная хроматография

В литературе описано несколько примеров удачного разделения углеводов при низком давлении с использованием в качестве неподвижной фазы угля [14]. Однако в настоящее время такие материалы, которые могли бы служить неподвижными фазами в адсорбционной ВЭЖХ углеводов, не производятся.

Силикагель, например, мало пригоден для разделения свободных сахаров, так как между силанольными группами силикагеля и гидроксильными группами углеводов возникает прочное адсорбционное взаимодействие [15]. Кроме того, углеводы ограниченно растворимы в неводных растворителях, которые обычно применяют в качестве элюента в сочетании с данным носителем. В то же время силикагель — прекрасная неподвижная фаза для хроматографического разделения умеренно полярных соединений, поэтому вполне вероятно, что в виде неполяр-

ных производных, например перацетатов, углеводы успешно удается разделить и на силикагеле.

Оксид алюминия как неподвижная фаза по своим свойствам незначительно отличается от силикагеля, но он менее инертен по отношению к углеводам, и при разделении на оксиде алюминия вероятность химического взаимодействия выше [16].

8.2.2. Жидко-жидкостная хроматография

Разделение углеводов методом жидко-жидкостной хроматографии при низком давлении традиционно проводилось на целлюлозе. Однако в настоящее время целлюлозу вытеснили ионообменные смолы, на которых можно осуществлять разделение при повышенном давлении [6, 17, 18]. Так, например, установлено, что смолы на основе полистирола, сшитого дивинилбензолом, содержащие разнообразные противоионы, обладают необходимой механической прочностью и могут служить неподвижной фазой в ВЭЖХ. Следует отметить, что относительное содержание воды в таких неподвижных фазах выше, чем в подвижной фазе, если в качестве последней используются водно-органические смеси, например водно-этанольные, поэтому полярные молекулы углеводов удерживаются неподвижной фазой.

Для разделения углеводов успешно применяются как анионо-, так и катионообменные смолы. Однако в большинстве статей описывается разделение на сильнокислотных катионообменниках, содержащих сульфогруппы. Такие носители широко используются, в частности, в аминокислотных анализаторах. Противоионами для катионообменников служат кальций, барий-, литий-, натрий- и калий-ионы, а также органические основания, например метил-, диметил- и триметиламмониевые ионы.

В качестве противоионов для анионообменников предпочтительны сульфат- и хлорид-ионы. В общем случае коэффициент емкости неподвижной фазы k зависит от структуры молекулы углевода, числа содержащихся в ней свободных гидроксильных групп и ее стереохимии. Коэффициент емкости увеличивается с увеличением числа гидроксильных групп в молекуле углевода. Кроме того, он зависит от температуры колонки. Оптимальной температурой, если исходить из длительности анализа и эффективности разделения, является температура 80°C и выше [19]. На разделение углеводов влияет их взаимодействие с противоионами, а также ситовый эффект, обусловленный особенностями строения матрицы ионообменной смолы [19].

Скоростное разделение в условиях жидко-жидкостной хроматографии обычно проводится на устойчивых к высокому давлению неподвижных фазах. Успешно применяются неподвижные фазы на основе немодифицированных силикагелей, на которые непосредственно в процессе разделения наносится тонкий слой

воды или водного раствора полифункциональных аминов [15, 21]. Однако в этом случае выбирать элюент следует достаточно осторожно, поскольку относительное содержание воды в элюенте должно быть небольшим, а углеводы, как известно, плохо растворимы в большинстве органических растворителей. Немодифицированные силикагели, кроме того, могут неспецифически взаимодействовать с углеводами, что снижает воспроизводимость результатов разделения.

Проводя разделение на неподвижных фазах с химически привитыми амино- или другими полярными группами, например диольными, можно избежать этих трудностей [22, 23]. В этом случае элюирование проводят смесями ацетонитрила ($<70\%$) или этанола ($<70\%$) с водой. В работе [24] описаны такие неподвижные фазы, которые позволяют применять в качестве элюентов водно-органические смеси с содержанием органического растворителя менее 40% .

8.2.3. Ионообменная хроматография

Нейтральные сахара имеют исключительно низкую кислотность. Проводить разделение сахаров, исходя из их способности к образованию ендиолятов, не представляется возможным, так как в результате возможной изомеризации идентификация пиков может быть неоднозначной.

В то же время кислые или основные сахара с успехом можно разделить при помощи ионообменной хроматографии [25—27]. Последовательность элюирования сахаров зависит от их pK , концентрации противоионов в элюенте, pH элюента и температуры. Кроме того, жидко-жидкостная и гель-хроматография имеют ряд своих характерных особенностей, которые необходимо учитывать.

Разделение сложных смесей углеводов лучше всего проводить на сильноосновных ионообменных смолах в боратной форме при использовании в качестве элюента боратных буферных растворов. Этот метод был предложен Кимом и Зиллом [8] и позднее с успехом использован рядом авторов [9, 11, 28—30].

Углеводы образуют анионные комплексы с борной кислотой [34]; этим свойством обладают все соединения, имеющие у соседних атомов углерода гидроксильные группы, лежащие в плоскостях, угол между которыми не превышает 60° . Устойчивость этих комплексов и их кислотность зависят от пространственного расположения гидроксильных групп (*цис* или *транс*, экваториального или аксиального) [10]. Элюируют боратные комплексы углеводов $0,05$ — $1,0$ М буферными растворами на основе борной кислоты (pH 7—10) как в изократическом, так и в градиентном режимах [9, 28—30].

8.3. Обнаружение

Для обнаружения незамещенных углеводов высокочувствительные детекторы, обычно применяемые в ВЭЖХ, практически непригодны, поскольку в молекулах этих соединений не содержатся соответствующие функциональные группы. Например, УФ-детекторы в данном случае могут работать лишь при длинах волн, меньших 200 нм, так как гидроксильные группы не поглощают при больших длинах волн.

Как правило, обнаружение углеводов основано на их физических свойствах, или же исследуемые углеводы на пред- или послеколоночной стадии переводят в соответствующие производные, для обнаружения которых можно воспользоваться высокочувствительными детекторами. Однако если в первом случае (при обнаружении по физическим свойствам) в результате разделения получают чистые соединения, то второй подход (пред- или послеколоночная модификация) приводит к получению производных разделяемых углеводов, и поэтому к нему нельзя прибегать, по крайней мере в большинстве ситуаций, в препаративных методах. Правда, можно разделить элюат на два потока, один из которых пойдет для сбора фракций, а второй — для их обнаружения.

8.3.1. Обнаружение по физическим свойствам

Оптическую активность углеводов можно использовать для их обнаружения только при относительно большой концентрации углеводов, так как метод характеризуется низкой чувствительностью [32]. Кроме того, интерпретация хроматограмм, полученных при помощи такого метода, затруднена, так как для них характерно перекрывание пиков. Применение УФ-детекторов для анализа свободных сахаров и полиолов возможно лишь при длинах волн ниже 200 нм, однако в этих условиях чувствительность метода низка. Тем не менее обнаружение кислых и ацилированных углеводов можно осуществлять при длинах волн 200—220 нм (область поглощения карбонильных групп, входящих в состав карбоксильных остатков). Обнаружение бензиловых и тритиловых эфиров, ароматических эфиров и ароматических агликоновых производных необходимо осуществлять при длинах волн, соответствующих их максимумам поглощения.

Наиболее широкое распространение получил рефрактометрический принцип обнаружения углеводов, однако селективность его, а в некоторых случаях и чувствительность бывают недостаточны.

Для обнаружения углеводов или их производных, имеющих свободную аномерную гидроксильную группу, можно использовать электрохимические детекторы, отличающиеся высокой чувствительностью и селективностью.

8.3.2. Послеколоночные реакции

Для послеколоночной модификации углеводов или их производных применяются три типа реакций, имеющих различную селективность. Эти реакции основаны на восстановительных свойствах свободных углеводов, способности их образовывать фурфуролы в кислой среде и на возможности окислительного расщепления гликолевой связи.

Рис. 8.1 позволяет сравнить селективность этих трех методов послеколоночной модификации. В табл. 8.1 проведена оценка селективности различных реагентов.

Углеводы и их производные со свободными аномерными гидроксильными группами восстанавливают в щелочной среде ионы меди(II) до меди(I), которые в свою очередь реагируют с Набицинхонинатом (4,4',2,2'-бикарбоксибихинолин) с образованием фиолетового комплекса [33]. Кроме того, углеводы и их производные со свободными аномерными гидроксильными группами восстанавливают [19] тетразолсульфоновую кислоту [10] до интенсивно окрашенных формазанов. В этом случае предел обнаружения может быть ниже 10^{-9} моль.

На рис. 8.2 показано направление потоков жидкости в реакционном детекторе.

В сильнокислой среде происходит расщепление углеводов, и в результате образуются фурфуролы и ряд соединений с меньшими молекулами, которые реагируют с некоторыми аромати-

Таблица 8.1. Селективность некоторых реагентов для послеколоночного модифицирования углеводов

Соединение или класс соединений	Си-бидинхонинат	Тетразол-сульфоновая кислота	Орсиц/серно-окислотный реагент	Периодат-ный реагент
Формальдегид	—	—	+	+
Гликольальдегид	+	+	+	+
Альдозы	+	+	+	+
Кетозы	+	+	+	+
Полиолы	—	—	—	—
Альдоновые кислоты	—	—	—	+
Уроновые кислоты	+	+	+	(+)
Сахарные кислоты	—	—	—	(+)
Сахариновые кислоты	—	—	—	+
Аминосахара	+	+	(—)	(+)
Фосфаты сахаров	(+)	(+)	+	(+)
Дезоксисахара	+	+	(+)	(+)
Олигосахариды				
восстанавливающие	+	+	+	(+)
невосстанавливающие	—	—	+	(+)
Полисахариды	—	—	+	(+)
Гликозиды	—	—	+	(+)

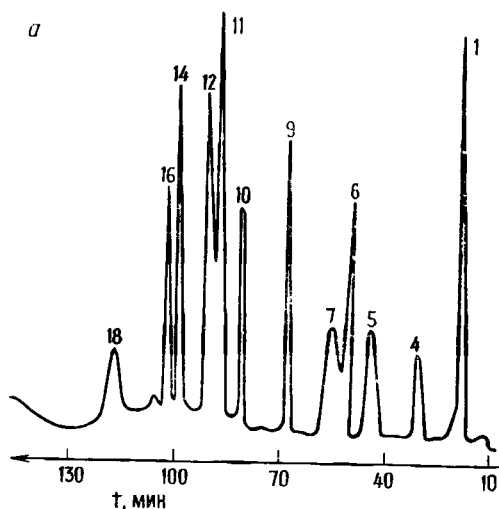


Рис. 8.1. Разделение стандартной смеси сахаров с послеколоночным модифицированием.

Колонка: $18 \times 0,6$ см; неподвижная фаза: сильноосновный ионообменник, 11 ± 1 мкм, боратная форма; элюент: боратные буферы, $0,2-1,4$ М, pH 8,6–9,5; объемная скорость: $0,6$ мл/мин; температура колонки: $40-67^\circ\text{C}$; проба: по 10 нмоль (*а* и *б*) и 50 нмоль (*в*) каждого компонента.

Послеколоночное модифицирование. а — реакция с бидинхоннатом меди: $0,1\%$ -ный раствор бидинхонната натрия, $0,05\%$ -ный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0,25\%$ аспартамовой кислоты в 1 М растворе карбоната натрия; объемная скорость: $0,45$ мл/мин; реакционная петля: $3000 \times 0,3$ мм; температура: 100°C ; обнаружение: при 570 нм.

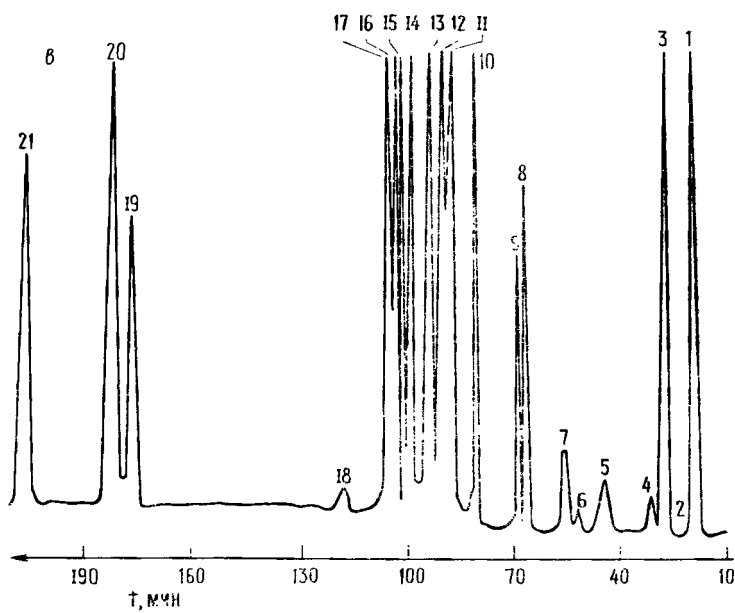
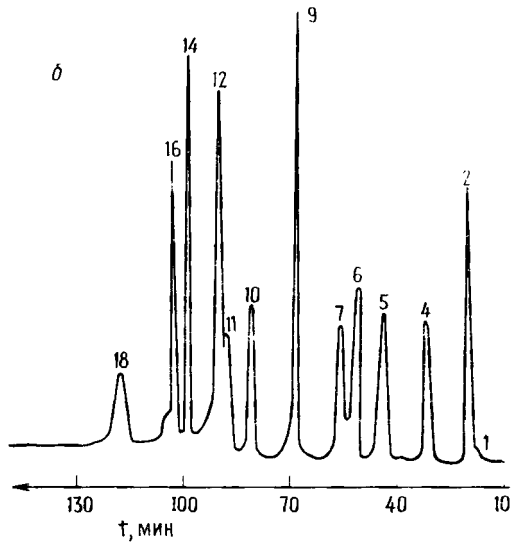
б — реакция с орсином: $0,1\%$ -ный раствор орсина в концентрированной серной кислоте; объемная скорость: $0,65$ мл/мин; реакционная петля: $2500 \times 0,5$ мм; температура: 100°C ; обнаружение: при 420 нм.

а — реакция с периодатом натрия: реагент I: $0,1\%$ -ный раствор периодата натрия в буферной смеси $0,5$ М ацетат аммония/уксусная кислота, pH 3,8, объемная скорость: $0,3$ мл/мин; реакционная петля: $1000 \times 0,3$ мм; температура: 100°C ; реагент II: $0,75\%$ -ный арсенит натрия/ 1% -ный ацетилацетон в буферной смеси $0,5$ М ацетат натрия/уксусная кислота, pH 4,0; объемная скорость: $0,3$ мл/мин; реакционная петля: $1500 \times 0,3$ мм; температура: 100°C ; обнаружение: при 420 нм.

1 — 2-дезоксирибоза; 2 — сахароза; 3 — глицерин; 4 — целлобиоза; 5 — мальтоза; 6 — рамноза; 7 — лактоза; 8 — мезоэритрит; 9 — рибоза; 10 — манноза; 11 — фруктоза; 12 — арабиноза; 13 — сорбит; 14 — ксилоза; 15 — арабит; 16 — глюкоза; 17 — мальнит; 18 — мелибиоза; 19 — глюкуроновая, 20 — глюконовая и 21 — галактуриновая кислоты.

ческими аминами и фенолами с образованием окрашенных соединений, точный состав которых не установлен. Эта особенность углеводов положена в основу ряда аналитических методик их обнаружения и идентификации. Чаще всего углеводы после разделения обрабатывают $0,1\%$ -ными растворами антрона [34] или орсина [10] в концентрированной серной кислоте. Схемы потоков в соответствующих детекторах не имеют принципиальных отличий от схемы потоков в бидинхонинатном детекторе. Данные о селективности реагентов приведены в табл. 8.1 (см. также рис. 8.1).

Известно, что 1,2-диолы обладают способностью к окислительному расщеплению связи C—C под действием периодатов. 1,2-Диолы с терминальными связями C—C образуют при окис-



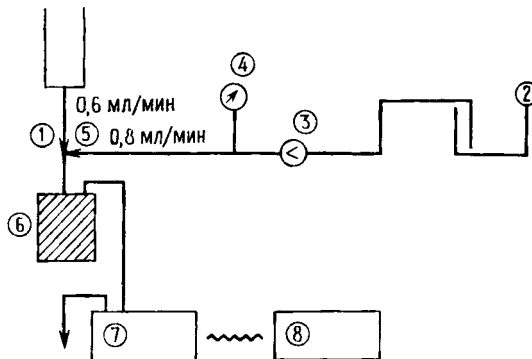


Рис. 8.2. Схема потоков жидкости при постколоночном модифицировании элюата бичинхонином меди.

1 — элюат, поступающий из разделительной колонки; 2 — реагент (0,05%-ный раствор бичинхонината натрия, 0,025%-ный раствор сульфата меди(II), 0,10%-ный раствор аспартамовой кислоты в 1,2 М водном K_2CO_3); 3 — мини-насос; 4 — манометр; 5 — Т-образное соединение (для смешивания); 6 — реакционная петля $3000 \times 0,3$ мм, $100-130^\circ C$; 7 — фотометр (570/420 нм); 8 — самописец.

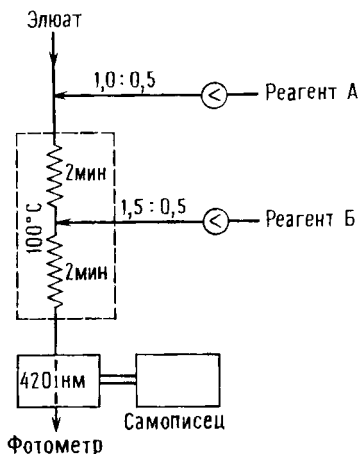
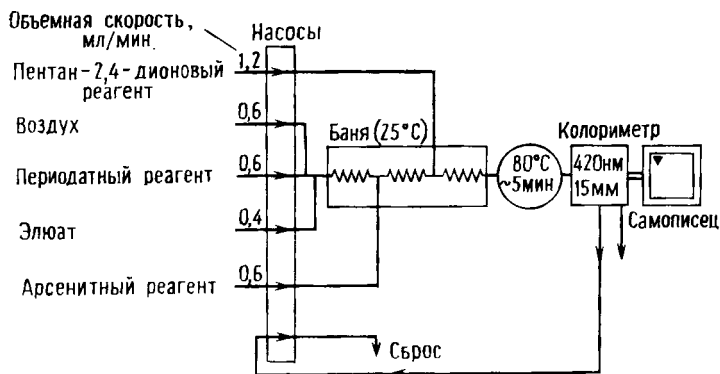


Рис. 8.3. Схема потоков жидкостей в двух системах для проведения постколоночной обработки элюата периодат-ацетилацетионовым реагентом.

а — многореагентная [6] и б — упрощенная [10] системы.

лении ряд других продуктов. Формальдегид реагирует с ацетил-ацетоном с образованием в присутствии ионов аммония желтых продуктов. К сожалению, в присутствии избытка периодата и образующейся иодной кислотой эти продукты окисляются. Для обнаружения углеводов с использованием указанной реакции был сконструирован детектор с многореагентным послеколоночным реактором (рис. 8.3, а) [18]. В работе [10] приведена схема детектора с комбинированным двухреагентным послеколоночным реактором (рис. 8.3, б). Поступающий из колонки элюат смешивается с раствором периодата натрия (0,25%) и ацетата аммония (1,5%) в 0,8 М натрий-ацетатном буфере, pH 3,2 (первый реагент). Реакция проводится в спиральном реакторе (внутр. диаметр 0,3 мм) в течение 2,5—3 мин при 100°C. Вторым реагент представляет собой раствор арсенита натрия (0,75%) и ацетилацетона (2%) в 0,5 М натрий-ацетатном буфере, pH 4,5. Реакция со вторым реагентом проходит в следующем реакторе того же диаметра при 100°C в течение 1,5—2,0 мин. Образующиеся окрашенные продукты обнаруживают фотометрически при длине волны 420 нм. Чувствительность данного метода несколько ниже, чем двух предыдущих.

8.4. Монодезоксид- и олигосахариды

Известно, что углеводы со свободными аномерными группами образуют в растворе в результате мутаротации равновесную смесь α - и β -аномеров в пиранозной и фуранозной формах. Наличие равновесных форм углеводов приводит к уширению хроматографических пиков, особенно при относительно низкой температуре.

Разделение свободных углеводов может протекать по механизму адсорбционной, распределительной, ионообменной или гель-проникающей хроматографии. Адсорбционная хроматография в настоящее время утратила свое первоначальное значение, тогда как остальные три принципа положены в основу наиболее важных современных методик анализа углеводов.

8.4.1. Жидко-жидкостная хроматография на ионообменных смолах

Этот метод был впервые предложен Самуэльсоном и др. [6, 17, 18]. Для разделения применяются ионообменные смолы на основе полистирола, сшитого дивинилбензолом, — анионообменники в SO_4^{2-} - или Cl^- -форме и катионообменники в OH^- -, Ca^{2+} - или Ba^{2+} -формах. Элюентом служит водный примерно 90%-ный раствор этанола. Обнаружение осуществляется при помощи реакционного детектора с использованием орсин-сернокислотного реагента.

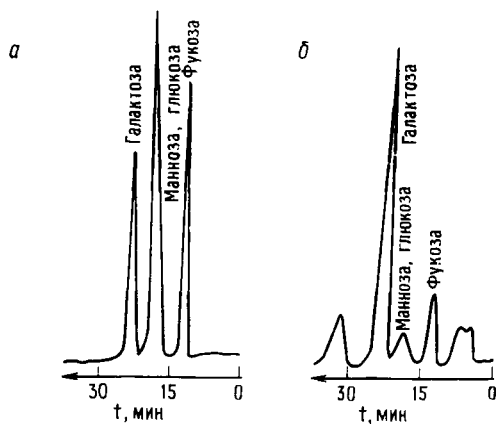


Рис. 8.4. Разделение стандартной смеси (а) и гидролизата гликопротеина (б) из слизистой оболочки желудка.

Колонка: $300 \times 0,4$ см; неподвижная фаза: сильноокислая ионообменная смола дурум, DC-44, Li-форма, 8 ± 1 мкм, Пало-Альто, США; температура 65°C ; элюент: 89%-ный этанол; объемная скорость: 0,3 мл/мин; обнаружение: в виде производного бидинхонната (последующее модифицирование).

Быстрое разделение углеводов было проведено при повышенных температурах на смоле техникон типа S (250 мкм) в сульфатной форме при элюировании 89%-ным водным этанолом [19]. В указанных условиях за 3 ч было разделено 8 углеводов. Для обнаружения была использована реакция с тетразолиевым синим.

Селективность этого способа разделения зависит от концентрации спирта в элюенте, вида противоиона, а также от степени сшивки смолы. Ионы щелочных, щелочноземельных и некоторых переходных металлов образуют комплексы с полигидроксильными соединениями и потенциальными ендиолятами. Например, аллозу, альтрозу и маннозу чрезвычайно трудно разделить на ионообменной смоле в сульфатной форме, однако на смоле в литиевой форме достигается прекрасное разделение. Эту же не-

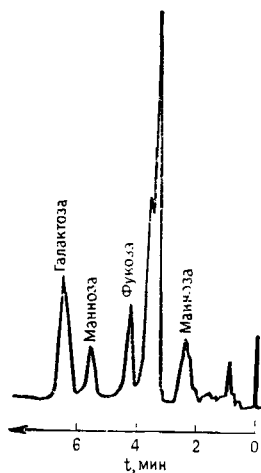


Рис. 8.5. Разделение гидролизата гликопротеина слизистой оболочки желудка (тот же препарат, что и на рис. 8.4).

Колонка: $20 \times 0,4$ см; неподвижная фаза: нуклеосил 5SA, 5 мкм; объемная скорость: 0,8 мл/мин; элюент: ацетонитрил/ H_2O (88 : 12); обнаружение: при 195 нм.

подвижную фазу можно использовать для разделения олигосахаридов, а также нейтральных сахаров, например маннозы, галактозы и фукозы, входящих обычно в состав гликопротеинов. Время разделения в последнем случае составляет 10—20 мин (рис. 8.4). Глюкозу и маннозу с помощью данного метода разделить не удастся.

Замена полистирол-дивинилбензольной матрицы на силикагель положительно влияет на эффективность разделения, по крайней мере на ионообменниках в литневой форме [23], что иллюстрирует рис. 8.5.

8.4.2. Жидко-жидкостная хроматография на силикагеле с нанесенной *in situ* или привитой полярной фазой

Проводить разделение моно- и олигосахаридов на немодифицированном силикагеле не рекомендуется, поскольку даже при небольшом содержании воды в элюенте, например при элюировании смесью ацетонитрил/вода, все углеводы элюируются очень быстро и, как правило, у полученных пиков наблюдаются большие хвосты. Некоторые авторы [15, 21], проводя разделение указанных соединений, добавляли в элюент полиамины [15, 21]. После пропитки силикагеля таким элюентом *in situ* неподвижная фаза приобретает высокую полярность и слабосильные свойства. В силу более высокой кислотности силанольные гидроксильные группы образуют с полиаминами более прочные связи, чем гидроксильные группы углеводов. Модифицированная полиаминами неподвижная фаза по своим свойствам напоминает аминофазу с химически привитыми аминок группами. Влияние полиамина (пиперазина) на разделение некоторых моносахаридов демонстрирует рис. 8.6. На этом же рисунке приведена хроматограмма, полученная на носителе с химически привитой аминофазой (как и на примере, показанном на рис. 8.4, разделению подвергался гидролизат гликопротеина, выделенного из слизистой оболочки желудка).

В работе [24] описаны химически привитые аминофазы, позволяющие использовать для разделения углеводов элюенты, содержащие до 40% воды.

Если исходить из получаемой последовательности элюирования, то можно предположить, что разделение происходит главным образом по механизму жидко-жидкостной распределительной хроматографии.

Для гомологических рядов углеводов, характеризующихся систематическим увеличением содержания гидроксильных групп, наблюдается увеличение коэффициента емкости. Первыми элюируются дезоксисахара, затем кетозы, альдозы и последними — полиолы. Эффективного разделения членов гомологических ря-

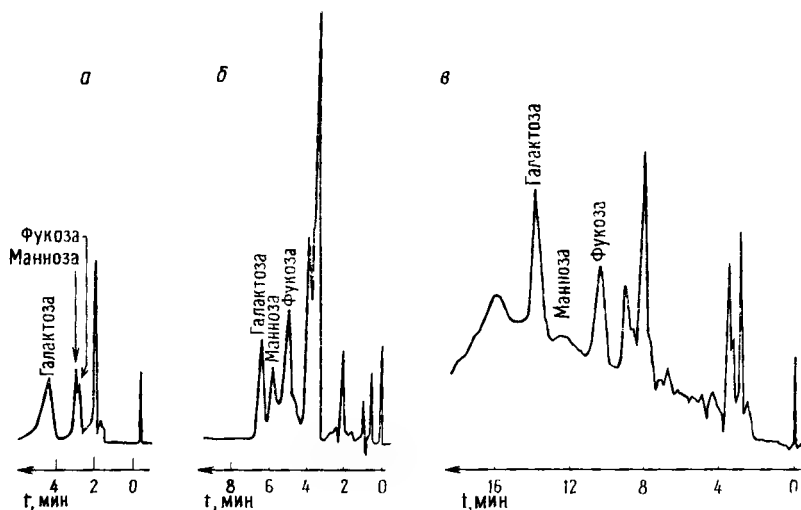


Рис. 8.6. Хроматограммы гидролизата гликопротеина из слизистой оболочки желудка.

Колонка: 250×4 мм; объемная скорость: 0,8 мл/мин; обнаружение: при 215 нм.

а — неподвижная фаза: силикагель мерк Si 60, 5 мкм; элюент: ацетонитрил/Н₂О (91%).
 б — неподвижная фаза: та же; элюент: 0,5% пиперазина в смеси ацетонитрил/Н₂О (88%).
 в — неподвижная фаза: аминофаза мерк лихросорб-амин, 5 мкм; элюент: ацетонитрил/Н₂О (88%).

дов с другими характерными признаками на индивидуальные соединения добиться более трудно.

Модифицированные силикагели и привитая аминофаза могут быть успешно использованы для разделения олигосахаридов (рис. 8.7). Последовательность элюирования в данном случае обратна наблюдаемой при проведении гель-проникающей хроматографии: время удерживания возрастает с увеличением степени полимеризации [35].

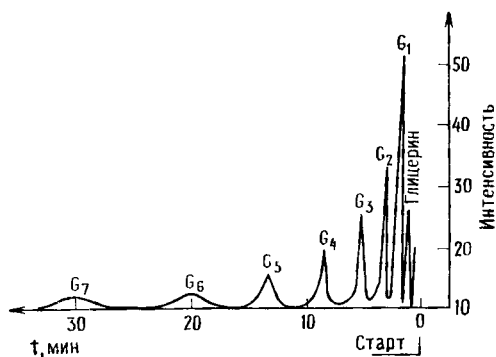


Рис. 8.7. Разделение мальто-олигосахаридов кукурузной патоки.

Колонка: 25×0,4 см; неподвижная фаза: μ -бондапак углеводов; элюент: ацетонитрил/Н₂О (89 : 11); обнаружение: при 195 нм.

8.4.3. Жидко-жидкостная хроматография на неполярной неподвижной фазе, обращенно-фазовая хроматография

Неподвижные фазы, используемые в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, например фазы ODS, обладают гидрофобными свойствами, напротив, углеводы характеризуются относительно высокой полярностью. Поэтому перед разделением углеводов на обращенных фазах их необходимо предварительно перевести в неполярные производные. В результате взаимодействия ароматических групп, введенных в состав углеводов, с неполярными неподвижными фазами существенно возрастают скорость и эффективность разделения.

8.4.4. Ионообменная хроматография на смолах в боратной форме

Эффективность разделения углеводов в виде боратных комплексов в значительной степени зависит от конформации углеводной части комплекса, числа и типа гидроксильных групп, величины угла между гликольными группами, а также от pH и температуры.

Аномерные гидроксильные группы характеризуются большим сродством к борат-иону, чем спиртовые гидроксильные группы. Более того, стабильность комплексов углеводов и, следовательно, коэффициент емкости зависят от равновесного соотношения их пиранозной и фуранозной форм. Экваториально-экваториально расположенные соседние гидроксильные группы образуют более устойчивые комплексы, чем экваториально-аксиальные. Комплексы с борат-ионами образуют не только 1,2- но и 1,3-диолы, поэтому происходит разделение галактозы и фукозы (6-дезоксигалактозы). Эффективность разделения зависит от pH. Обычно для разделения углеводов в качестве элюентов применяют 0,01—1,0 М буферные растворы с pH 5—10.

Разделение проводят при повышенных температурах. К сожалению, при относительно невысоких температурах ряд сахаров может расщепляться. Некоторые авторы [37] добавляют в боратные буферные растворы диолы (при умеренных значениях pH сродство диолов и борат-ионов незначительно), с тем чтобы свести до минимума вероятность щелочной перегруппировки сахаридов. Однако при умеренных значениях pH при температурах ниже 40°C сколько-нибудь заметного расщепления сахаров не происходит. Если хроматографирование осуществляется в условиях температурного градиента, разделение происходит успешно. На рис. 8.8 представлена хроматограмма гидролизата гликопротеина слизистой оболочки желудка, полученная в ус-

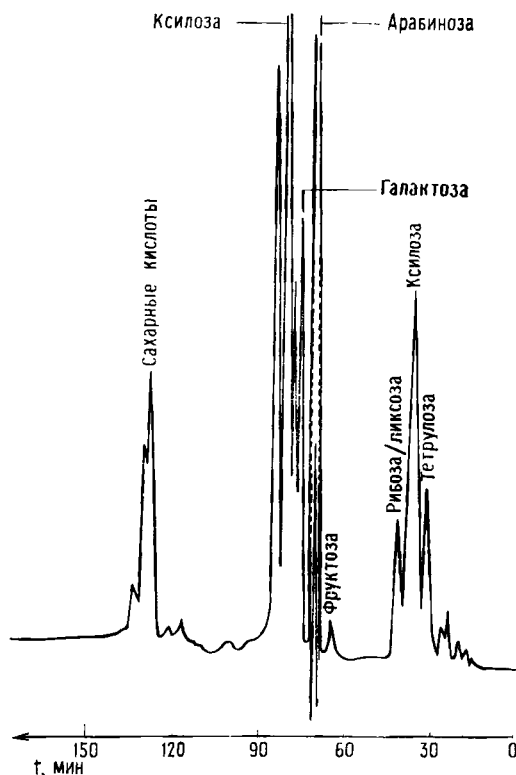


Рис. 8.8. Разделение сложной смеси углеводов — «формозы».

Колонка: $18 \times 0,6$ см; неподвижная фаза: сильноосновная ионообменная смола дуррум, DA-X-8-11, 11 мкм, Пало-Альто, США; элюент: боратный буфер, 0,2—1,4 М, pH 8,6—9,5; объемная скорость: 0,6 мл/мин; температура колонки: 38—62 °C; обнаружение: при 420 нм с использованием послеколонного модифицирования периодат-ацетилацетоновым методом.

ловнях изократического элюирования (тот же гликопротеин, что и на хроматограммах, показанных на рис. 8.4 и 8.6).

Возможность разделения нейтральных сахаров, аминсахаров и аминокислот будет обсуждена в разд. 8.5.

Применение боратного метода в целях клинического анализа позволило, например, установить наличие ганглиозидов сахаров и спинномозговой жидкости больных нервными расстройствами [38]. Для проведения массовых клинических анализов необходима эффективная методика разделения компонентов анализируемой смеси. Вследствие высокой специфичности орсин-сернокислотного метода обнаружения подготовку проб для клинического анализа можно упростить и ограничиться удалением из нее белков с молекулярной массой, большей 10^3 Д (например, при помощи фильтрации на ультрамембранах).

8.4.5. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)

ГПХ наиболее пригодна для разделения смесей углеводов, различающихся по молекулярной массе. Следует, однако, заметить, что для ГПХ при высоком давлении можно использовать всего

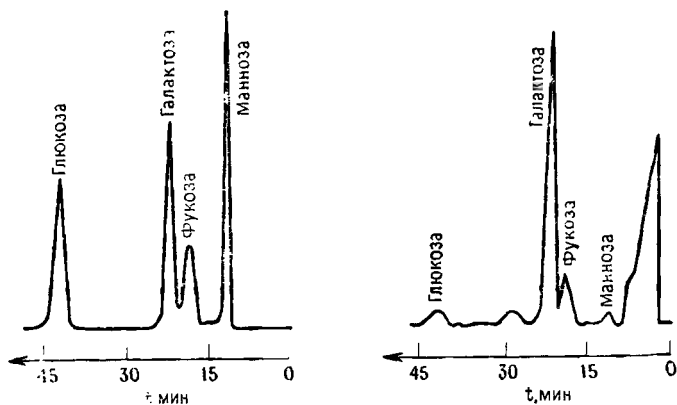


Рис. 8.9. Разделение гидролизата гликопротеина из слизистой оболочки желудка.

Элюент: 0,4 М боратный буфер, pH 9,3; температура колонки: 55 °С; остальные условия см. в подписи к рис. 8.8.

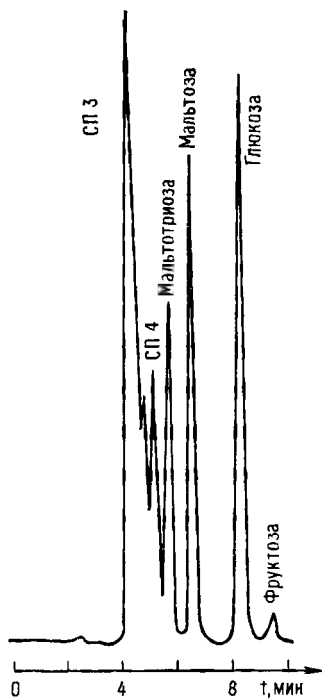


Рис. 8.10. Разделение олигосахаридов кукурузного сиропа.

Колонка: 30×0,65 см; неподвижная фаза: интерэкшнн JC 6020 углеводов; элюент: вода; температура колонки: 90 °С; объемная скорость: 0,5 мл/мин; детектор: рефрактометрический.

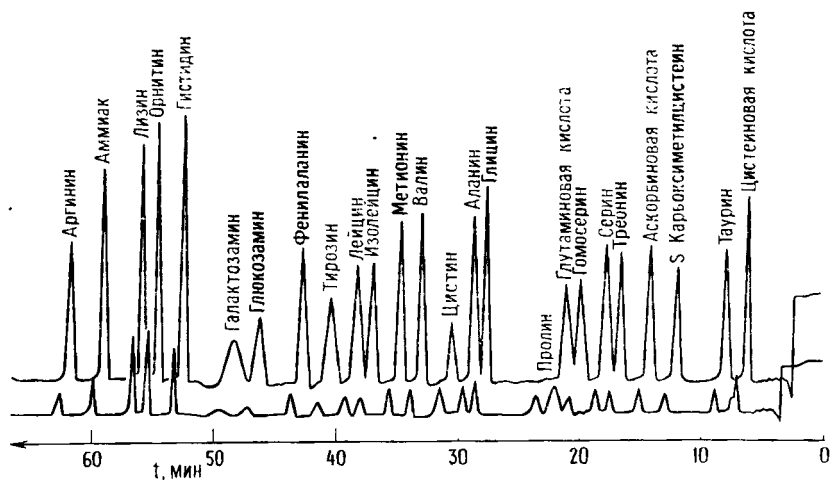


Рис. 8.11. Разделение аминокислот в присутствии аминокислот.

Колонка: 20×0,32 см; неподвижная фаза: сильноокислая ионообменная смола ВТС 2710/7 мкм (Biotronik, ФРГ); элюент: цитрат натрия, от 0,1 до 1,0 М, рН 3,4—4,6; объемная скорость: 0,4 мл/мин; градиент температуры: 46—68 °С; проба: по 5 нмоль каждого компонента.

несколько неподвижных фаз. По этой причине разделение углеводов при помощи ГПХ проводят главным образом при низком давлении на полиакриламидных гелях, сефарозе и т. д. На рис. 8.10 показано разделение ряда мальтоз на неподвижной фазе на основе полистирола.

8.5. Аминосакхара

Разделение свободных аминокислот следует проводить при помощи ионообменной хроматографии. Элюирование с кислотных ионообменных смол осуществляется буферными растворами с кислотным значением рН или разбавленными кислотами [39]. Часто для разделения аминокислот используются стандартные аминокислотные анализаторы с постколоночной модификацией нингидриновым реагентом. Если образец содержит смесь аминокислот и аминокислот, то молярность и рН буфера-элюента необходимо подбирать так, чтобы аминокислота элюировалась после фенилаланина, но перед аминокислотами, обладающими основными свойствами (рис. 8.11).

В литературе описаны примеры одновременного разделения смесей нейтральных сахаров, аминокислот и аминокислот [27]. Путем использования хроматографических систем с небольшой предколоной, заполненной ионообменной смолой в H^+ -форме, и автоматическим переключателем колонок можно определять

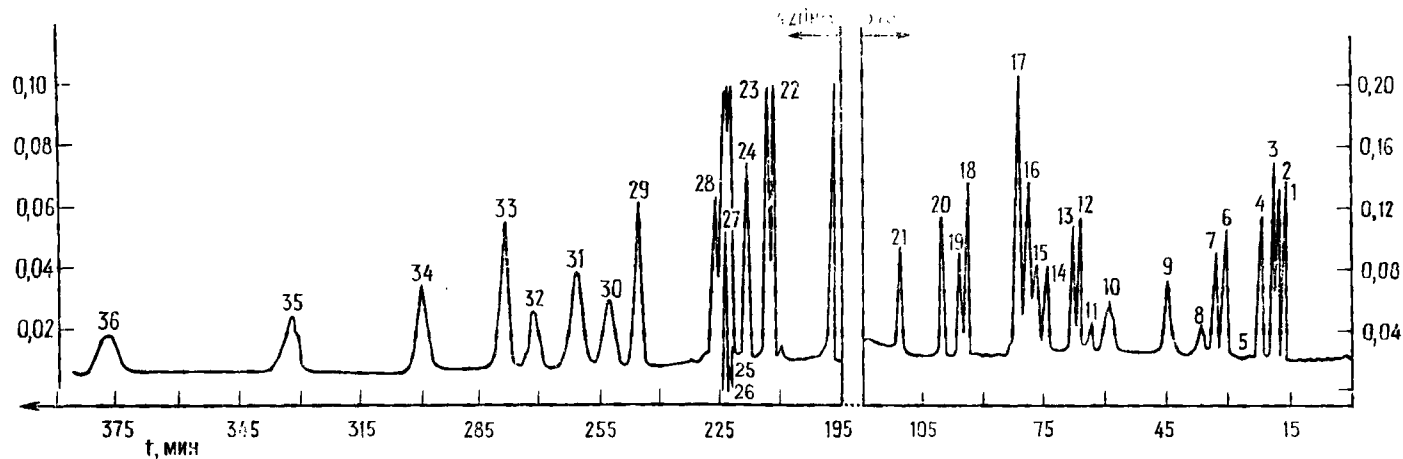


Рис. 8.12. Разделение смеси аминокислот, аминосугаров и нейтральных сахаров [27].

Предколонка: 5×4 мм; неподвижная фаза: смола DC-8-9; колонка для разделения аминокислот и аминосугаров: 25×0,4 см; неподвижная фаза: та же; колонка для разделения нейтральных сахаров: 16×0,4 см; неподвижная фаза: смола DA-X-8-8; объемная скорость: 0,24 мл/мин; давление: 80–110 бар; обнаружение: при 570 (ингидрин) или 420 нм (орсин-сернокислотный метод); проба: по 2,05 нмоль каждой аминокислоты и по 4,40 нмоль каждого аминосугара и нейтрального сахара.

1 — аспартамовая кислота; 2 — треонин; 3 — серин; 4 — пролин; 5 — глицин; 6 — аланин; 7 — цистин; 8 — валин; 9 — метионин; 10 — метионин; 11 — неизвестное вещество; 12 — изолейцин; 13 — лейцин; 14 — тирозин; 15 — фенилаланин; 16 — галактозамин; 17 — глюкозамин; 18 — лизин; 19 — аммоний-ион; 20 — гистидин; 21 — аргинин; 22 — сахароза; 23 — трегалоза; 24 — целлобиоза; 25 — мальтоза; 26 — рамноза; 27 — лактоза; 28 — рибоза; 29 — манноза; 30 — фруктоза; 31 — арабиноза; 32 — галактоза; 33 — ксилоза; 34 — глюкоза; 35 — гентиобиоза; 36 — медибиоза.

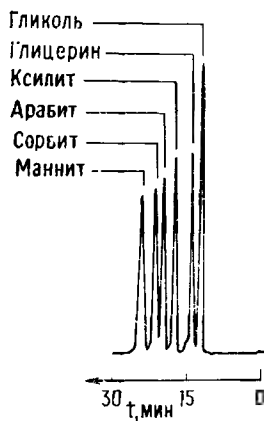


Рис. 8.13. Разделение полиолов.

Колонка: 25×0,6 см; неподвижная фаза: основная ионообменная смола дуррум DA-X-8-11, 14 мкм; элюент: боратный буфер, 0,8 М, pH 9,4; обнаружение: с использованием послеклоночного модифицирования периодат-ацетилацетоном.

без введения дополнительного внутреннего стандарта субмикrogramмные количества гликопротеинов (рис. 8.12).

В целях препаративного разделения целесообразно применять легколетучий элюент, например, на основе пиридина и уксусной кислоты.

Аминосакхара можно разделять и в виде их производных. Хроматографическое поведение производных аминсахаров обусловлено природой и числом содержащихся в них заместителей. Если аминогруппы блокированы, как, например, в природных N-ацетилированных аминсахарах, то свойства, присущие аминсахарам как основаниям, утрачиваются, и ионообменная хроматография становится неприменимой. Вместе с тем, однако, появляется возможность использовать весь арсенал хроматографических методов, разработанных для разделения нейтральных сахаров.

8.6. Альдиты

Молекулы альдитов насыщены гидроксильными группами, поэтому условия их разделения практически не отличаются от условий разделения нейтральных сахаров. Наиболее широкое применение нашла жидко-жидкостная ионообменная хроматография и особенно боратный метод, позволяющий добиться наибольшей селективности разделения. Порядок элюирования строго соответствует правилу Боесекена [31]: *транс*-диолы элюируются перед *цис*-диолами. Влияние терминальных диольных групп сказывается слабее. Например, пентиты элюируются в следующем порядке: ксилит, арабинит $\approx$ ликсит и рибит.

На рис. 8.13 приведен пример разделения альдитов на ионообменной смоле в боратной форме (размер частиц 8 мкм, изократический режим элюирования, обнаружение при помощи периодатного реагента).

8.7. Сахарные кислоты

Наиболее эффективный метод аналитического и препаративного разделения альдоновых, уроновых, сахарных и сахариновых кислот и других кислых производных сахаров — анионообменная хроматография. В некоторых случаях элюирование боратным буфером обеспечивает дополнительное увеличение селективности.

8.7.1. Уроновые кислоты

Большинство хроматографических методов разделения уроновых кислот, описанных в литературе, предусматривает использование низких давлений. Например, галакто- и глюкуроновая кислоты были разделены на дауэксе-1 при элюировании 0,15 М уксусной кислотой [40].

Авторы работы [41] разделили смесь, состоящую более чем из 10 компонентов, на ионообменной смоле с частицами небольшого размера. При хроматографировании на полистирол-дивинилбензольной смоле со степенью сшивки 8% и элюировании 0,6—1,0 М калий-боратным буфером (рН 8—10) уроновые кислоты элюируются после нейтральных сахаров [42].

8.7.2. Альдоиновые, сахарные и сахариновые кислоты

Наиболее эффективное разделение углеводов этого класса осуществляется на сильноосновных ионообменных смолах в боратной форме [20]. При помощи этого метода удается разделить кислоты с одинаковым значением pK ; разделение осуществляется в соответствии с их способностью образовывать комплексы с борной кислотой.

Из «формозы» — смеси сахаров, полученной в результате реакции [43], были выделены и обнаружены несколько альдоновых и сахариновых кислот, а также нейтральные сахара и полиолы (см. рис. 8.8). Порядок элюирования, если не учитывать величины pK , опять-таки соответствует правилу Боесекена.

На ионообменной смоле была с успехом разделена также смесь, состоящая из аскорбиновой кислоты, нейтральных сахаров, уроновых и изоаскорбиновых кислот [44, 45].

8.8. Фосфаты сахаров

Наиболее важным методом анализа и выделения из природных продуктов производных сахарных кислот этого класса является ионообменная хроматография. Однако стабильность фосфатов

сахаров невелика, особенно в кислой или щелочной среде. Если же не учитывать это, то хроматографическое поведение фосфатов сахаров аналогично хроматографическому поведению других сахарных кислот.

8.9. Гликозиды, простые и сложные эфиры, ацетали

Хроматографическое поведение гликозидов с простыми агликонами аналогично хроматографическому поведению свободных моносахаридов и полиолов. Разделение по механизму распределительной хроматографии проводится на неподвижных фазах на основе силикагеля или полистирол-дивинилбензола (см. разд. 8.4.1 и 8.4.2). Однако разделение углеводов этих классов — и свободных сахаров и полиолов на ионообменных смолах в боратной форме — существенно различается. Потеря активной аномерной гидроксильной группы приводит к снижению прочности комплексов этих производных с борной кислотой и соответственно к уменьшению коэффициента емкости [10]. Объемные и неполярные агликоны также могут решающим образом влиять на хроматографические свойства углеводов. Разделение углеводов этого класса может быть осуществлено при помощи обращенно-фазовой или гель-проникающей хроматографии.

Хроматографическое поведение ацеталей и простых или сложных эфиров углеводов, отличающихся по числу гликозидных звеньев, не совпадает с поведением свободных олигосахаридов. Большинство частично или полностью замещенных производных углеводов неполярны или слабо полярны. Поэтому ацильные, бензоильные, бензильные, метилированные изопропилиденные или бензилиденные производные следует разделять при помощи жидко-твердофазной хроматографии, например на силикагеле, или обращенно-фазовой хроматографии.

8.10. Полисахариды

Единого метода, который можно было бы рекомендовать для хроматографического разделения полисахаридов, их очистки и определения аналитических характеристик в настоящее время, по-видимому, не существует. Нейтральные полисахариды обычно разделяют при помощи гель-проникающей хроматографии. В некоторых случаях проводят разделение боратных комплексов полисахаридов при помощи ионообменной хроматографии; селективность разделения при этом повышается. К сожалению, в качестве неподвижных фаз для гель-проникающей хромато-

графии могут использоваться лишь очень немногие материалы. Поэтому большинство методик разделения полисахаридов основано на хроматографии низкого давления. Разделение кислых и основных полисахаридов проводят на ионообменных смолах.

Устойчивые к высокому давлению неподвижные фазы имеют относительно небольшой предел эксклюзии (10^3 — 10^5 Д), что не позволяет разделять на них полисахариды с большой молекулярной массой.

Литература

1. Cramer F. *Angew. Chem.*, **62**, 73 (1950).
2. Stahl E., Kaltenbach U. J. *Chromatogr.*, **5**, 351 (1961).
3. Whistler R. L., Durso D. F. J. *Am. Chem. Soc.*, **72**, 677 (1950).
4. McNeely H. W., Binley W. W., Wolfrom M. L. J. *Am. Chem. Soc.*, **67**, 527 (1945).
5. Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. A. J. *Chem. Soc.*, 2511, 1949.
6. Arwidi B., Samuelson O. *Svensk. Kem. Tidskr.*, **722**, 84 (1965).
7. Roseman S., Abeles R. H., Dorman A. *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 232 (1952).
8. Khym J. Y., Zill L. P. J. *Am. Chem. Soc.*, **74**, 2090 (1952).
9. Kesler R. B. *Anal. Chem.*, **39**, 1416 (1967).
10. Bauer H. Thesis, Tübingen University, 1975.
11. Bauer H., Voelter W. *Chromatographia*, **9**, 433 (1976).
12. Sweekley C. C., Bentley R., Makita M., Wells W. W. J. *Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497 (1963).
13. König W. A., Bauer H., Voelter W., Bayer E. *Chem. Ber.*, **106**, 1905 (1973).
14. Baker S. A., Bourne J. J., Theander O. J. *Chem. Soc.*, **1955**, 4276.
15. Boumahraz M., Davydov V. Ya., Kiselev A. V. *Chromatographia*, **15**, 751 (1982).
16. Ennor K. S., Honeyman J., Shaw C. J. B., Stening T. C. J. *Chem. Soc.*, **1958**, 2921.
17. Havlicek J., Petersson G., Samuelson O. *Acta Chem. Scand.*, **26**, 2205 (1972).
18. Matsui H., Paart E., Samuelson O. *Chem. Sci.*, **1**, 45 (1971).
19. Mopper K., Degens E. T. *Anal. Biochem.*, **45**, 147 (1972).
20. Hernanto A. R. Thesis, Tübingen University, 1983.
21. Aitzetmüller K. *Chromatographia*, **13**, 432 (1980).
22. Yang M. T., Milligan L. P., Mathison G. W. J. *Chromatogr.*, **209**, 316 (1981).
23. Bauer H., Shalaby A., Voelter W. в печати.
24. Orth P., Engelhardt H. *Chromatographia*, **15**, 9 (1982).
25. Martinsson E., Samuelson O. *Chromatographia*, **3**, 405 (1970).
26. Hjepre A., Antonopoulos C. A., Classon B., Engfeldt B. J. *Chromatogr.*, **202**, 453 (1980).
27. Tikhomirov M. M., Knorlin A. Ya., Voelter W., Bauer H. J. *Chromatogr.*, **167**, 197 (1978).
28. Kesler R. B. *Anal. Chem.*, **39**, 1416 (1967).
29. Voelter W., Bauer H. *Chem. Exp. Didakt.*, **1**, 203 (1975).
30. Voelter W., Bauer H. J. *Chromatogr.*, **126**, 693 (1976).
31. Boeseken J. *Rec. Trav. Chem.*, **61**, 82 (1942).
32. Kuo J. C., Yeung E. S. J. *Chromatogr.*, **223**, 321 (1981).
33. Mopper K., Gindler E. M. *Anal. Biochem.*, **56**, 440 (1973).
34. Moose E. E. *Anal. Chem.*, **19**, 1012 (1947).
35. Katsuma K., Nakakuki T., Ogawa T. J. *Chromatogr.*, **212**, 126 (1981).
36. Daniel P. F., Lott I. T., McCluer R. H., in: Hawk G. L. (Ed.): *Biological/*

- Biomedical Applications of Liquid Chromatography, III, p. 363, Marcel Dekker, Inc. New York, 1981.
37. *Walborg E. F., Ray D. B., Öhrberg L. E.* Anal. Biochem., **29**, 433 (1969).
 38. *Seuffer R., Voelter W., Bauer H. J.* Clin. Chem. Clin. Biochem., **15**, 663 (1977).
 39. *Brendel K., Toszel N. O., Wheat R. W., Davidson E. A.* Anal. Biochem., **18**, 147 (1967).
 40. *Khym J. X., Doherty D. G. J.* Am. Chem. Soc., **74**, 3199 (1952).
 41. *Carlsson B., Samuelson O.* Anal. Chim. Acta, **49**, 247 (1970).
 42. *Bauer H.* неопубликованные данные.
 43. *Hernanto A. R., Voelter W., Bauer H.*, in: Proceedings XIth International Carbohydrate Symposium, Vancouver, Canada, 1982.
 44. *Geigert J., Hirano D. S., Neidleman S. L.* J. Chromatogr., **206**, 396 (1981).
 45. *Bui-Nguyen M. H.* J. Chromatogr., **196**, 163 (1980).

Азотистые основания, нуклеозиды и нуклеотиды

Г. Шотт (H. Schott)

9.1. Введение

Многие задачи, связанные с анализом, выделением, синтезом нуклеиновых кислот и их фрагментов, удалось удовлетворительно решить лишь с появлением ВЭЖХ. Естественно, что разделение олиго- и полинуклеотидов и нуклеиновых кислот представляет собой менее сложную проблему, чем разделение азотистых оснований, нуклеозидов и мононуклеотидов, однако, как это будет показано в данной главе, уже разработаны надежные хроматографические методы, позволяющие решить обе эти проблемы.

Нуклеиновые кислоты, как известно, являются носителями генетической информации. Они делятся на два класса: дезоксирибонуклеиновые (ДНК) и рибонуклеиновые (РНК) кислоты. ДНК и РНК представляют собой длинные линейные макромолекулы, состоящие из нуклеотидов, соединенных 3', 5'-фосфодиэфирными связями (рис. 9.1). Скелет ДНК образован дезоксирибозами, соединенными фосфодиэфирными связями. Различные ДНК отличаются последовательностью азотистых оснований (первичной структурой). В состав ДНК входят два пуриновых и два пиримидиновых основания. Пуриновые основания представлены аденином (А) и гуанином (G), пиримидиновые основания — тимин (Т) и цитозин (С). РНК отличается от ДНК, во-первых, видом пентозного остатка. В отличие от ДНК, в состав которой входит рибоза, РНК содержит дезоксирибозу. Во-вторых, в состав РНК входит урацил, а в состав ДНК — тимин. Кроме того, молекулы РНК содержат также многочисленные модифицированные основания. РНК, как правило, имеет одноцепочечное строение, исключение составляют лишь РНК некоторых вирусов.

Мономерные звенья нуклеиновых кислот, мононуклеотиды, содержат какое-либо одно из азотистых оснований и соответствующий пентозный углеводный остаток (рибозу или дезоксирибозу). Фрагменты нуклеиновой кислоты (рис. 9.1), содержащие до 10 мономерных звеньев, называются олигонуклеотидами, а более длинные фрагменты — полинуклеотидами.

Вначале мы приведем примеры разделения при помощи

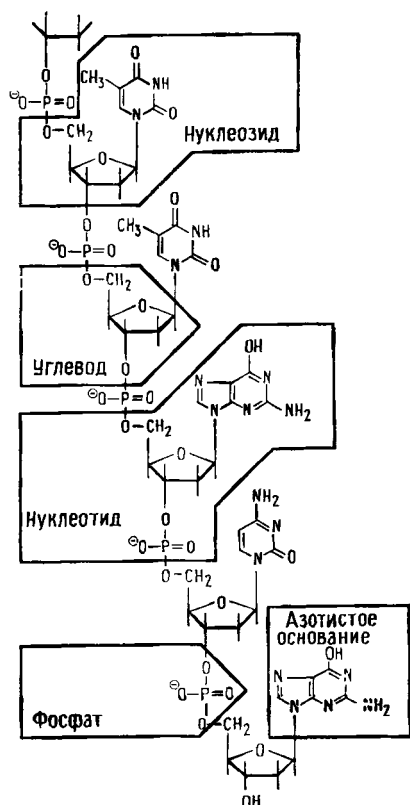


Рис. 9.1. Схема одонитового фрагмента молекулы ДНК.

ВЭЖХ основных компонентов нуклеотидов, далее обсудим возможности разделения олиго- и полинуклеотидов, а в заключение рассмотрим роль ВЭЖХ в синтезе олигонуклеотидов.

9.2. Методы разделения азотистых оснований, нуклеозидов и моонуклеотидов

В настоящее время разработаны методики разделения азотистых оснований, нуклеозидов и моонуклеотидов при помощи ВЭЖХ [1, 2]. Разделение азотистых оснований или нуклеозидов чаще всего проводится на катионообменных, а разделение нуклеотидов — на анионообменных смолах.

9.2.1. Ионообменники

Возможность использования ионообменников в ВЭЖХ подробно исследована авторами работы [3]. Оптимальные условия разделения азотистых оснований на катионообменниках указаны в

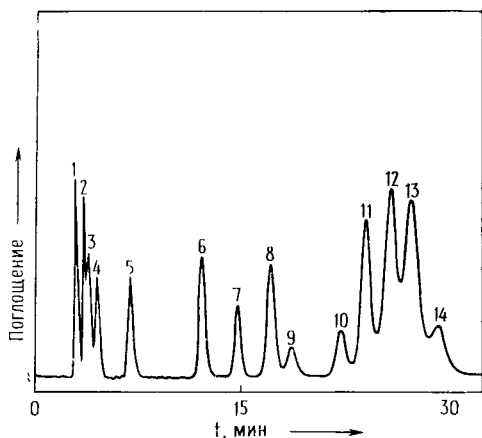


Рис. 9.2. Разделение смеси азотистых оснований и нуклеозидов [5].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: аминекс А-28; элюент: 5 мМ цитратный + 50 мМ фосфатный буферный раствор (рН 9,25) + 55%-ный этанол; температура: 70 °С; обнаружение: при 260 нм.

1 — 5-метилцитозин; 2 — цитозин; 3 — аденозин; 4 — цитидин; 5 — тимидин; 6 — тимин; 7 — урацил; 8 — уридин; 9 — аденин; 10 — гуанин; 11 — гипоксантин; 12 — ксантин и гуанозин; 13 — инозин; 14 — ксантозин.

работе [4]. Разделение оснований можно также проводить на аминексе А-7 при элюировании 1 М фосфатным буферным раствором (рН 2,75) при температуре 50 °С. Если же неподвижной фазой служит аминекс А-28, элюирование необходимо осуществлять 0,4 М фосфатно-боратным буферным раствором (рН 8,25, 45 °С). В литературе опубликованы (в виде таблиц) данные по зависимости заряда различных аналогов азотистых оснований от рН раствора. Систематически изучено влияние на время удерживания на аминексе А-28 азотистых оснований (пурина и пиримидина) и соответствующих им нуклеозидов состава элюента на основе водно-этанольных смесей с добавками электролита [5]. Исследованы влияние значения рН, вида и концентрации противоиона, содержания этанола в элюенте и температуры на время удерживания и эффективность разделения. Полученные результаты показывают, что при изократическом элюировании все перечисленные параметры имеют очень важное значение для оптимизации разделения оснований и нуклеозидов. Так, при соответствующем выборе условий хроматографирования смесь, состоящую из 14 компонентов, удалось разделить за 30 мин (рис. 9.2).

Возможности обсуждаемой системы фаз можно продемонстрировать также на примере разделения гидролизата ДНК из тимуса теленка.

При помощи ВЭЖХ на слабых анионообменниках на основе силикагеля были разделены самые различные смеси нуклеиновых кислот [6]. Этот метод позволил осуществить некоторые относительно сложные анализы, например разделить смеси 2'-, 3'- и 5'-АМФ или рибо- и дезоксирибонуклеозидов и нуклеотидов. Можно привести и другие примеры разделения, проведенного в условиях изократического или градиентного элюирования: раз-

деление смесей моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов, нуклеозидов и азотистых оснований, смеси олигонуклеотидов. Методика разделения таких смесей сравнительно проста: хроматографирование проводится при температуре окружающей среды и завершается достаточно быстро. В большинстве случаев успешное разделение достигалось точным подбором концентрации и pH буферного раствора или в результате добавления органического модификатора. В некоторых случаях целесообразно прибегнуть к градиентному элюированию.

Авторами работы [7] предложен экспресс-метод очистки дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, имеющих радиоактивную метку, и образующихся одновременно с ними дезоксирибонуклеозидди- и дезоксирибонуклеозидмонофосфата и дезоксирибонуклеозида. Разделение происходит в течение 3 мин (или менее) на колонке ($5 \times 0,1$ см), заполненной лихросорбом- NH_2 , при элюировании 0,025 М фосфатом калия (30 мл/ч, pH 6,8, температура комнатная).

9.2.2. Обращенная фаза

Разделение смесей нуклеиновых кислот желательно проводить при помощи простой разделительной системы, т. е. на одной колонке при элюировании одним элюентом. Методом распределительной обращенно-фазовой ВЭЖХ были разделены семь природных нуклеозидов и их оснований. Разделение и количественное определение нуклеозидов и их оснований (в присутствии нуклеотидов) можно осуществить в течение 30 мин, если использовать для этого колонки, заполненные тонкодисперсной неподвижной фазой. Точность, надежность и воспроизводимость результатов хорошие. Пики на хроматограммах клеточных экстрактов были идентифицированы по относительному поглощению или по методу ферментативного сдвига пика. Применение этой методики в биохимических исследованиях изложено в работе [8].

Четыре компонента трех различных фрагментов ДНК (основания, нуклеозиды и мононуклеотиды) были с хорошим разрешением разделены на колонке с зорбаксом при элюировании 0,4 М $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 3,5 (рис. 9.3) [9]. Эта методика позволила определить состав азотистых оснований, содержащихся в 1 мкг ДНК. Как выяснилось, разделение дезоксигуанозина и дезокситимидин-5'-монофосфата, а также дезоксиаденозина и дезоксиаденозин-5'-монофосфата в этих условиях проходит с плохим разрешением. Увеличение длины колонки или же использование градиентного элюирования, по-видимому, улучшает разрешение. Хроматографическое поведение аденина, дезоксиаденозина и дезоксиаденозин-5'-монофосфата несколько отличается от такового для других компонентов ДНК: время удерживания этих

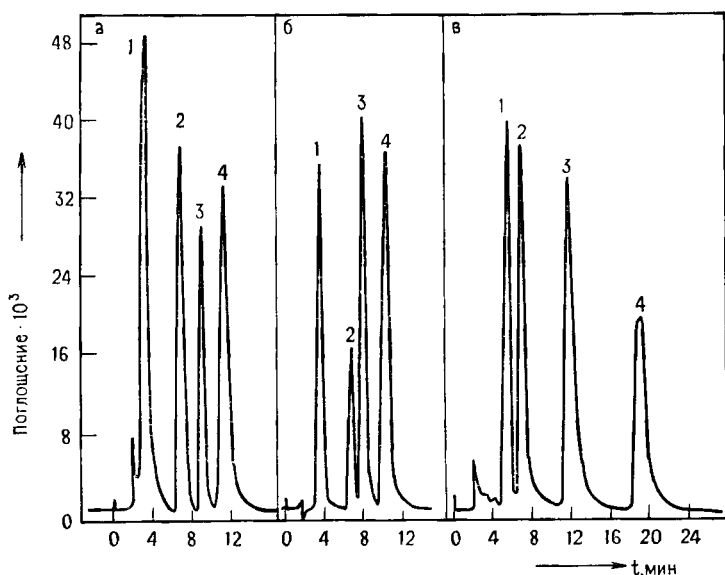


Рис. 9.3. Разделение смеси азотистых оснований (а), дезоксирибонуклеозид-5'-монофосфатов (б) и 2'-дезоксирибонуклеозидов (в) [9].

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: 0,4 М фосфат аммония (рН 3,5); температура: 40 °С; обнаружение: при 240 нм.

а) 1 — цитозин; 2 — гуанин; 3 — тимин; 4 — аденин; б) 1 — дезоксицитидин-5'-монофосфат; 2 — дезокситимидин-5'-монофосфат; 3 — дезоксигуанозин-5'-монофосфат; 4 — дезоксиаденозин-5'-монофосфат; в) 1 — дезоксицитидин; 2 — дезоксигуанозин; 3 — дезоксиаденозин; 4 — дезокситимидин.

трех соединений существенно увеличивается с увеличением рН элюента. Время удерживания дезоксиаденозин-5'-монофосфата несколько меньше, чем аденина и дезоксиаденозина. Время удерживания соединений уменьшается с увеличением в элюенте концентрации фосфата аммония, тогда как на время удерживания дезоксиаденозин-5'-монофосфата этот фактор или вообще не оказывает влияния, или слегка увеличивает его. Изучение кривой элюирования оснований с радиоактивной меткой показало, что небольшие количества гуанина, тимина и аденина элюируются вслед за цитозином и что зона аденина размывается. Это может служить причиной меньшего выхода этих соединений. Более того, не исключено также, что рассматриваемый метод может давать несколько завышенное содержание цитозина в ДНК.

В работе [10] описан метод селективного определения аденозина в присутствии других компонентов нуклеиновых кислот. Согласно этой методике, разделение проводится на колонке, заполненной обращенной фазой с частицами малого размера, при изократическом элюировании разбавленным раствором дигидро-

фосфата калия и безводным метанолом. Селективное выделение аденозина достигается менее чем через 10 мин. В работе приведен пример использования этой методики в биохимических исследованиях.

Авторы работы [11] предложили методику быстрого количественного определения содержания гуанина (G) плюс цитозина (C) в пробах ДНК после гидролиза 88%-ной муравьиной кислотой. Для проведения анализа достаточно 10 мкг ДНК. Хотя тимин иногда плохо отделяется от примесей, перемещающихся с фронтом растворителя, содержание (G+C) можно точно установить, используя соотношение $C/(A+C)$ или $(G+C)/(2A++G+C)$, при условии что концентрация A известна. Содержание (G+C), найденное при помощи ВЭЖХ, хорошо согласуется с данными, полученными исходя из результатов определения температур плавления и плавучей плотности ДНК десяти видов бактерий и двух грибов.

В работе [12] предложен экспресс-метод полного разделения четырех тимидин<>тимин димеров на колонке с обращенной фазой C_{18} и на новой «кассетной» системе, разработанной фирмой Waters (RC-55). В этой же работе описано разделение при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ оптически активных стереоизомеров, а также изомеров *мезо*-циклобутадитимидина (timiновых димеров, T< >T). Тиминовые димеры представляют собой наиболее характерный вид повреждений, индуцируемых в ДНК при облучении биологических систем ближним и дальним УФ.

Разработан метод ВЭЖХ, позволяющий осуществлять контроль за гидролитическим расщеплением 5-иодо-2'-дезоксиридина в водном растворе, а также исследовать стабильность этого соединения [13]. Разделение 5-иодо-2'-дезоксиридина и продуктов его разложения проводят на колонке, заполненной бондапаком C_{18} , при элюировании смесью метанол/вода. На основании экспериментальных данных были установлены кинетический порядок и константы скорости обеих последовательных реакций.

Группы уридин-5'-монофосфат, цитидин-5'-монофосфат, аденозин-5'-монофосфат и гуанозин-5'-монофосфат, аденозин-5'-монофосфат, аденозин-5'-дифосфат и аденозин-5'-трифосфат разделяют на колонке с обращенной фазой в изократическом режиме элюирования в присутствии тетра-*n*-бутиламмониевого иона [14]. Отмечено, что 12 нуклеозиддифосфатов и циклический аденозин-5'-монофосфат в изократических условиях не разделяются, однако их можно выделить при градиентном элюировании, увеличивая ионную силу и концентрацию метанола. Урацил, цитозин, аденин и гуанин, а также рибонуклеозиды этих оснований были разделены в присутствии 10-камфаросульфат-ионов.

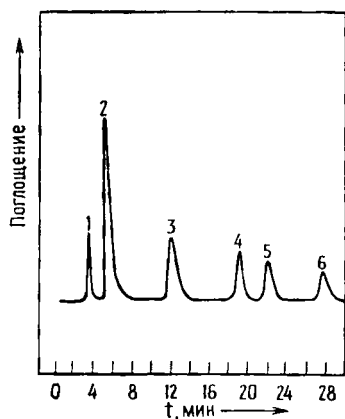


Рис. 9.4. Разделение смеси рибонуклеозид-5'-монофосфатов [17].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ультрасфер ODS; элюент: 2,5 мМ тетрабутиламмонийгидроксид+12% метанола, pH 2,5 (добавляют муравьиную кислоту); температура: комнатная; обнаружение: при 254 нм.
1 — цитидин-5'-монофосфат; 2 — аденозин-5'-монофосфат; 3 — гуанозин-5'-монофосфат; 4 — уридин-5'-монофосфат; 5 — инозин-5'-монофосфат; 6 — ксантозин-5'-монофосфат.

Скорость разделения полярных растворимых в воде соединений на обращенной фазе увеличивается в результате введения в систему алкилатов четвертичного аммония, выполняющих роль противоионов при образовании ионных пар [15, 16]. Ион-парная хроматография на обращенной фазе требует по сравнению с ИОХ менее сложного хроматографического оборудования. Более того, если разделение проводится по методу ИПХ, регенерировать колонку не требуется, что существенно уменьшает длительность анализа. Шесть природных 5'-рибонуклеозидмонофосфатов были разделены при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ путем элюирования смесями, содержащими ионы тетраметил-, тетраэтил- или тетрабутиламмония (рис. 9.4), влияние которых на эффективность разделения снижается в ряду бутил- > этил- > метиламмоний-ион. Эти ион-парные реагенты влияют на разделение любых нуклеозидмонофосфатов, если элюирование ведется кислым водным элюентом, содержащим метанол. Следует отметить, что такой состав элюента фактически обеспечивает количественный выход разделяемых нуклеотидов и облегчает их выделение, так как все элюенты не содержат фосфатов и достаточно летучи.

Авторы работы [18] отделили распространенные адениновые нуклеотиды (аденозинмоно-, аденозинди-, аденозинтрифосфат) при помощи ИПХ от их сульфопроизводных (аденозин-5'-фосфосульфат, аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфат) [18]. Никотинамидадениндинуклеотидфосфат, флавинадениндинуклеотид и аденозин-3',5'-бифосфат также удалось отделить от их нуклеотидов при помощи ИПХ при быстром изократическом элюировании, вводя в состав элюента гидроксид тетрабутиламмония. Метод отличается хорошими характеристиками, в частности хорошим значением коэффициента емкости, и позволяет осуществлять непрерывное обнаружение в потоке ^{35}S -меченых нуклеоти-

дов. Он был использован для исследования кинетики действия фермента аденозин-3'-фосфат:5'-сульфатотрансферазы, принимающего участие в процессе восстановления высшими растениями.

9.2.3. Аффинная хроматография

Для разделения азотистых оснований и нуклеозидов авторы работы [19] использовали колонки, заполненные пористыми сферическими частицами смолы диаметром 12—15 мкм с привитым тиминном. Синтезируют такие смолы путем суспензионной сополимеризации глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата в присутствии разбавителя. Авторы указанной работы осуществили разделение при комнатной температуре, элюентом служила дистиллированная вода. Сравнение удерживаемых объемов азотистых оснований и нуклеозидов показало, что аденин и аденозин удерживаются наиболее сильно, а гуанин и гуанозин удерживаются дольше, чем другие три пиримидиновых основания или нуклеозиды пиримидиновых оснований. Более того, удерживаемые объемы этих трех пиримидиновых оснований или трех нуклеозидов пиримидиновых оснований существенно различаются, и разделить пять оснований нуклеиновых кислот и пять нуклеозидов можно за короткое время. Результаты исследований, проведенных с использованием в качестве элюентов 1 М растворов хлорида натрия и мочевины и колонок, заполненных указанной выше смолой и такой же смолой, но не содержащей химически привитого тимина, позволяют сделать вывод, что между азотистыми основаниями и нуклеозидами и неподвижной фазой, модифицированной тиминном, существует взаимодействие.

В литературе подробно описана методика разделения соединений, в молекулах которых содержатся диольные группы (например, нуклеозидов, нуклеотидов, катехоламинов, углеводов и тРНК), на боратзамещенной полимерной неподвижной фазе. Вицинальные диольные группы способны, по-видимому, к обратимому образованию циклических боратных эфиров. Прочность эфирных связей зависит от pH, ионной силы, температуры и, если проводится разделение компонентов нуклеиновых кислот, от структуры азотистого основания. Авторы работ [20, 21] предложили использовать в ВЭЖХ для разделения смесей нуклеозидов, нуклеотидов или углеводов в качестве неподвижной фазы полихлортрифторэтилен (10 мкм) [20] или пористый силикат с химически привитой (ковалентные связи) 3-аминобензолборной кислотой (рис. 9.5).

Непосредственное определение нуклеозидов в плазме крови представляет собой особенно трудную задачу вследствие их чрезвычайно низкого и непостоянного эндогенного уровня у

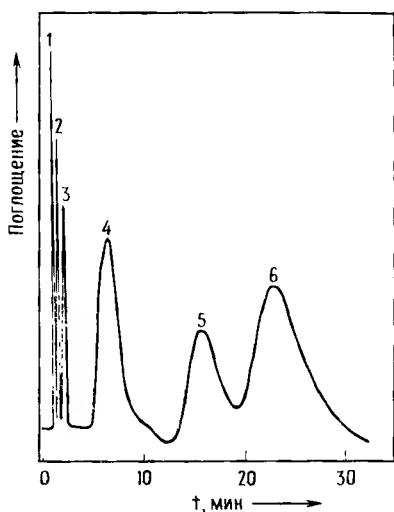


Рис. 9.5. Разделение смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидов [21].

Колонка: 100×5 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: силкагель с химически привитыми боратыми группами; элюент: 0,1 М фосфат натрия (рН 7,5); температура: комнатная; обнаружение: при 260 нм. 1 — тимидин и дезокситимидин; 2 — дезоксицитозин и уридин; 3 — дезоксиаденозин; 4 — цитозин и уридин; 5 — гуанозин; 6 — аденозин.

здоровых людей, а также вследствие маскирующего влияния других компонентов плазмы. Как показали результаты исследований, борзамещенные полимеры, например аффигель (Bio-Rad, Labs., США) [22] или бороник асидгель (Aldrich, США) [23], пригодны для предварительного фракционирования и концентрирования нуклеозидов плазмы крови, что позволяет существенно повысить чувствительность, а также селективность их последующего анализа при помощи ВЭЖХ. Во всех пробах, исследованных с применением аффигеля, было с достаточной степенью надежности определено содержание в плазме человека по крайней мере двух нуклеозидов (при нормальном их уровне) — инозина и аденозина. Правильность идентификации пиков и результатов количественной оценки содержания этих двух соединений подтвердили данные, полученные при помощи метода ферментативного сдвига пиков.

9.2.4. Растворимые комплексы металлов

Потенциальная пригодность для ВЭЖХ фаз с химически привитыми ионами металлов показана относительно недавно [24, 25]. Для изучения хроматографического поведения растворенных соединений, способных образовывать внешнесферные комплексы с соединениями кобальта, была приготовлена новая химически привитая фаза с Co(en)_3^{3+} [26]. В качестве контрольных соединений были выбраны нуклеотиды и нуклеозиды. Как выяснилось, разделяемые соединения образуют довольно прочные комплексы с неподвижной фазой, что значительно увеличивает время их удерживания, в частности время удержива-

ния трифосфатнуклеотида. Добавление в подвижную фазу $Mg(II)$ существенно улучшило эффективность разделения и сократило его длительность при прочих равных условиях. Хромотографические характеристики $Co(en)_3^{3+}$ -фаз сравнивались с аналогичными характеристиками обращенной фазы C_{18} и диаминовой системы. Во всех трех случаях добавление $Mg(II)$ в подвижную фазу приводило к положительному эффекту.

9.3. Анализ компонентов нуклеиновых кислот в биологических объектах

Определение компонентов нуклеиновых кислот в биологических объектах осуществляют при помощи различных методик ВЭЖХ, включая ионообменную и обращенно-фазовую. Большинство таких методик предназначены для разделения азотистых оснований и нуклеозидов [27, 28] или только нуклеотидов [20—31] и предусматривают предварительное удаление из пробы сопутствующих компонентов. Для характеристики различных типов ДНК и РНК большое значение имеет анализ азотистых оснований и их нуклеозидов в гидролизатах ДНК и РНК. Результаты определения содержания азотистых оснований и их нуклеозидов в клеточных экстрактах в ряде случаев позволяют выявить генетически обусловленные заболевания (синдром Лех-Нихана, дефицит ферментов аденозин-дезаминазы или нуклеозид-фосфоорилазы), приводящие к изменениям метаболизма пурина и пиримидина. Более того, важную информацию дает контроль метаболизма аналогов пурина и пиримидина, используемых в качестве лекарственных препаратов при терапии раковых заболеваний. Определенный интерес представляет также контроль за изменением содержания нуклеозидов и азотистых оснований в сыворотке крови и моче (в первом случае он позволяет диагностировать злокачественные новообразования, во втором — различные типы злокачественных заболеваний).

9.3.1. Отдельные нуклеозиды и мононуклеотиды

Рядом исследователей было проведено тщательное изучение возможности разделения при помощи ВЭЖХ содержащихся в сыворотке нуклеозидов, азотистых оснований и других низкомолекулярных соединений, поглощающих в УФ-области. Разделение проводилось на химически привитых тонкодисперсных неподвижных фазах при градиентном элюировании смесями буферный раствор/метанол, и в указанных условиях многие биологически важные соединения удалось разделить с максимальной эффективностью при минимальном времени разделения (рис. 9.6).

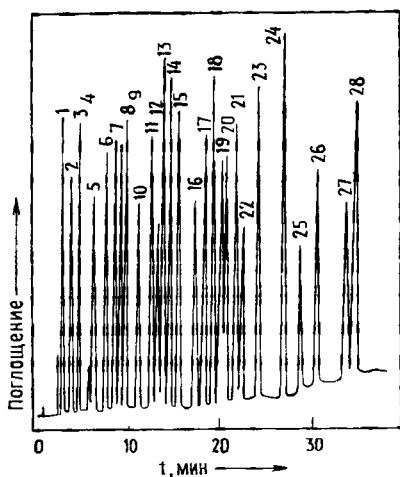


Рис. 9.6. Разделение азотистых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов, ароматических аминокислот и их метаболитов (0,1—0,5 нМ) [32].

Неподвижная фаза: обращенная фаза C_{18} на пористом силихроме (10 мкм); элюент: от 0,02 М KH_2PO_4 (рН 5,6) до 60% метанола; линейный градиент: 0,69%/мин (0—60% метанола за 87 мин); объемная скорость: 1,5 мл/мин, температура: комнатная; обнаружение: при 254 нм; объем пробы: 40 мкл; концентрация каждого из стандартов: 10^{-5} М.
 1 — цитозин; 2 — оротидин; 3 — урацил; 4 — L-тирозин; 5 — цитидин; 6 — гипоксантин; 7 — уридин; 8 — 5-аминоимидазолкарбоксамидрибозид; 9 — 7-метилянозин; 10 — 7-метилксантозин; 11 — 7-метилгуанозин; 12 — β -никотинамидаденидинуклеотид; 13 — инозин; 14 — гуанозин; 15 — 2'-дезоксининозин; 16 — 2'-дезокситимидин; 17 — 1-метилянозин; 18 — N₁-метилгуанозин; 19 — N₁-метилгуанозин; 20 — кинуреновая кислота; 21 — аденозин; 22 — теобромин; 23 — диметилгуанозин; 24 — теофиллин; 25 — дифиллин; 26 — 6-метиладенозин; 27 — индолнл-3-пропионовая кислота; 28 — кофеин.

В работе [32] приведены данные о времени удерживания (табл. 9.1, см. стр. 481), относительном поглощении (280/254 нм) и интенсивности флуоресценции 86 нуклеозидов, азотистых оснований, нуклеотидов и других соединениях.

Авторы работы [33] определили нуклеотидные профили кислотных экстрактов тромбоцитов у здоровых и больных людей. Стандартные кривые, полученные для каждого из трех основных нуклеотидов, имеют линейную форму во всем изученном диапазоне концентраций, а элюирование стандартов, добавляемых в гомогенаты тромбоцитов, проходит эффективно и воспроизводимо. Результаты определений, проведенных при помощи ВЭЖХ, хорошо согласуются с полученными другими способами. Методика анализа проста и дает хорошо воспроизводимые результаты и потому представляет большой интерес в свете ее возможного использования для изучения метаболизма нуклеотидов у больных.

В работе [34] опубликована методика определения на внутриклеточном уровне свободных дезоксирибонуклеотидов. Авторы работы проводили их разделение на колонке, заполненной лихросорбон- NH_2 при элюировании калий-фосфатным буфером.

Порядок элюирования нуклеотидов был следующим: цитидин-5'-монофосфат, аденозин-5'-монофосфат, уридин-5'-монофосфат, инозин-5'-монофосфат, гуанозин-5'-монофосфат и ксантидин-5'-монофосфат. Эта методика позволяет определять дезоксирибонуклеотиды в эпидермисе, что в свою очередь дает возможность оценить биологические характеристики и роль метаболизма ДНК в эпидермисе в норме, а также изменения, наблюдаемые при различных патологических состояниях.

Для разделения и количественного анализа пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов авторы работы [35] воспользовались ВЭЖХ на ионнообменных смолах. Этот метод может быть использован для анализа экстрактов культивируемых линий лимфоидных клеток человека. Анализировать таким способом можно $(1-2) \cdot 10^6$ клеток за 150 мин. После субкультивирования быстро увеличивается содержание растворимых внутриклеточных нуклеотидов. Однако это может быть обусловлено увеличением размеров клеток, а не повышением внутриклеточной концентрации нуклеотидов. Различий в содержании пуриновых нуклеотидов в нормальных клетках и клетках, дефицитных по гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе, обнаружено не было. Однако в клетках неожиданно высоким оказалось содержание растворимых пиримидиновых нуклеотидов. Рост нормальных клеток подавлялся гуанином или гуанозином в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ или 10^{-4} моль/л соответственно. Предполагают, что это вызвано заметным увеличением содержания гуанозин-5'-трифосфат-пула и уменьшением содержания адениновых и пиримидиновых нуклеотидов.

В работе [36] представлен метод определения тканевого пула уридиндезоксифосфата, цитидина, дезоксицитидина и моно-, ди- и трифосфатов тимидина. Он предусматривает проведение ионного обмена и разделение при помощи ВЭЖХ на препаративной колонке после превращения нуклеотидов в нуклеозиды под действием кислой фосфатазы. Обнаружение осуществляется УФ-детектором при 254 и 280 нм. Выход составляет $80 \pm 2\%$, предел обнаружения 100 пмоль нуклеотида в пробе. Путем повторного хроматографирования соответствующих фракций нуклеозидов предел обнаружения каждого соединения можно снизить до 10 пмоль. Выход, включая эту стадию, составляет $66 \pm 7\%$. Метод характеризуется хорошей воспроизводимостью и высокой селективностью. Нижний предел чувствительности составляет примерно 0,1 мкмоль/л для пробы ткани массой 150—250 мг (влажная масса). Этот метод был использован для определения содержания нуклеотидного пула в культурах клеток печени и лимфомы (S-49) мышей (в последнем случае в среде 5-фторурацила или без него).

Метод определения 14 основных клеточных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и 2'-дезоксирибонуклеотидов опубликован в работе

[37]. Вначале исследуемую пробу фракционируют при помощи анионообменной ВЭЖХ, далее нуклеотиды гидролизуют до соответствующих нуклеозидов щелочной фосфатазой и полученную смесь разделяют методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с обнаружением по поглощению (УФ-детектор). Метод характеризуется высокой воспроизводимостью и специфичностью, предел обнаружения компонентов смеси составляет 10 пмоль в пробе. Выход нуклеозидов, получаемых из нуклеотидов, составляет 85%. Пул пуриновых нуклеотидов был определен в культуре клеток лимфомы Т (S-49) мыши до и после 3-часовой обработки 2,0 мкМ микофенольной кислотой — ингибитором фермента инозин-5'-монофосфат-дегидрогеназы. Контрольные уровни по нуклеотидам, полученные данным способом, согласуются с результатами исследования клеток S-49, проведенных при помощи других методов, и указывают, что после обработки клеток микофенольной кислотой содержание гуаниновых нуклеотидов уменьшается, а содержание инозин-5'-монофосфата увеличивается.

9.3.2. Азотистые основания, нуклеозиды и моионнуклеотиды

Метаболизм пуриновых и пиримидиновых моионнуклеотидов представляет собой сложный биохимический процесс, играющий важную роль в функционировании и размножении клеток. Изменение в тонкоконтролируемом содержании этих метаболитов, вызываемое каким-либо генетическим нарушением или под влиянием антиметаболитов, приводит к изменению клеточной функции, а потенциально — к клеточной токсичности. Механизм этих изменений изучен пока слабо. Очевидно, было бы желательно измерить изменение в метаболизме моионнуклеотидов, с тем чтобы выявить те механизмы, которые ведут к нарушению клетки. Таким образом, одновременное определение всех пуриновых и пиримидиновых метаболитов в клетках, полученных от людей с соответствующими нарушениями, может дать ценную информацию. ВЭЖХ позволяет разделить смесь, в состав которой входят все типы пуриновых оснований, рибонуклеозидов и рибонуклеотидов, и определить количественный состав смеси за один цикл [39], т. е. получить очень важную для изучения метаболизма информацию [40]. После усовершенствования данной хроматографической системы с ее использованием была разделена за один цикл смесь, состоящая из пуриновых и пиримидиновых оснований, рибонуклеозидов и рибонуклеотидов. Разделение проводилось на колонке размером $700 \times 1,8$ мм, заполненной анионообменной смолой, при градиентном элюировании раствором хлорида аммония (рис. 9.7). Длительность разделения составила всего 160 мин. Потенциальные возможно-

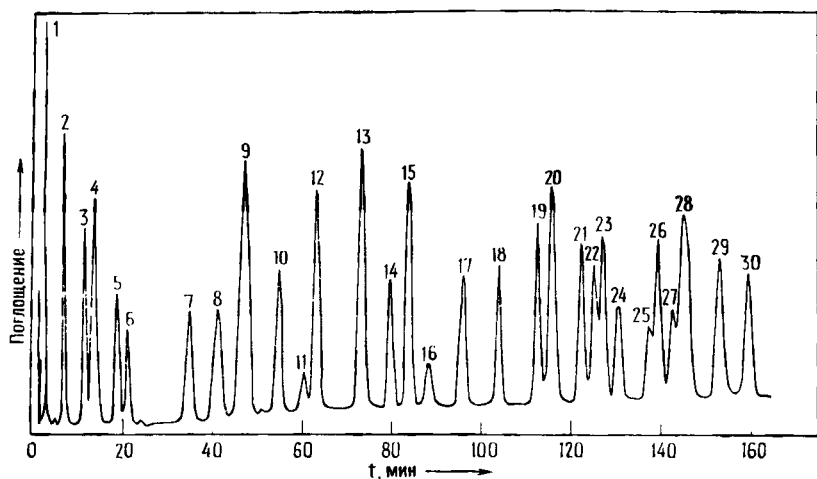


Рис. 9.7. Разделение оснований, нуклеозидов и нуклеотидов [41].

Колонка: 700×1,8 мм; неподвижная фаза: аминекс А-25; элюент: от 70 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /45 мМ NH_4Cl в 2,5%-ном этаноле (рН 9,15) до 10 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ /500 мМ NH_4Cl (рН 8,8). линейный градиент, 15 мин; объемная скорость: 0,5 мл/мин; температура: 65 °С; обнаружение: при 254 нм.

1 — цитозин; 2 — цитидин; 3 — тимидин; 4 — аденозин; 5 — тимин; 6 — урацил; 7 — гуанин; 8 — аденин; 9 — уридин; 10 — гипоксантин; 11 — ксантин; 12 — гуанозин; 13 — ниозин; 14 — цитидин-5'-монофосфат; 15 — тимидин-5'-монофосфат; 16 — ксантозин; 17 — аденозин-5'-монофосфат; 18 — уридин-5'-монофосфат; 19 — цитидин-5'-дифосфат; 20 — гуанозин-5'-монофосфат и тимидин-5'-дифосфат; 21 — ниозин-5'-монофосфат; 22 — аденозин-5'-дифосфат; 23 — уридин-5'-дифосфат; 24 — цитидин-5'-трифосфат; 25 — тимидин-5'-трифосфат; 26 — гуанозин-5'-дифосфат; 27 — уридин-5'-трифосфат; 28 — аденозин-5'-трифосфат и ксантозин-5'-монофосфат; 29 — гуанозин-5'-трифосфат; 30 — аденилсукцинат.

сти применения данного метода для количественного выделения растворимых в кислоте метаболитов фибробластов иллюстрирует рис. 9.8.

Преимущества рассмотренного выше подхода перед другими способами анализа внутриклеточных пуриновых и пиримидиновых производных заключаются в возможности разделения и количественного определения одновременно всех природных пуриновых и пиримидиновых оснований, рибонуклеозидов и рибонуклеотидов. Этот метод был использован для изучения метаболизма ^{14}C -меченых пуриновых и пиримидиновых производных. Одновременное измерение радиоактивности разных пулов дает ценную информацию о функционировании метаболических путей, так как удельную активность меченых метаболитов можно рассчитать. Приведенный выше режим элюирования позволил отделить также некоторые дезоксипроизводные от рибозопроизводных.

Авторы работы [42] предложили одноколонную систему для одновременного разделения оснований, нуклеозидов и нуклеозидмонофосфатов и нуклеозидполифосфатов на основе высокопористого анионообменника аминекс А-14. Разделение про-

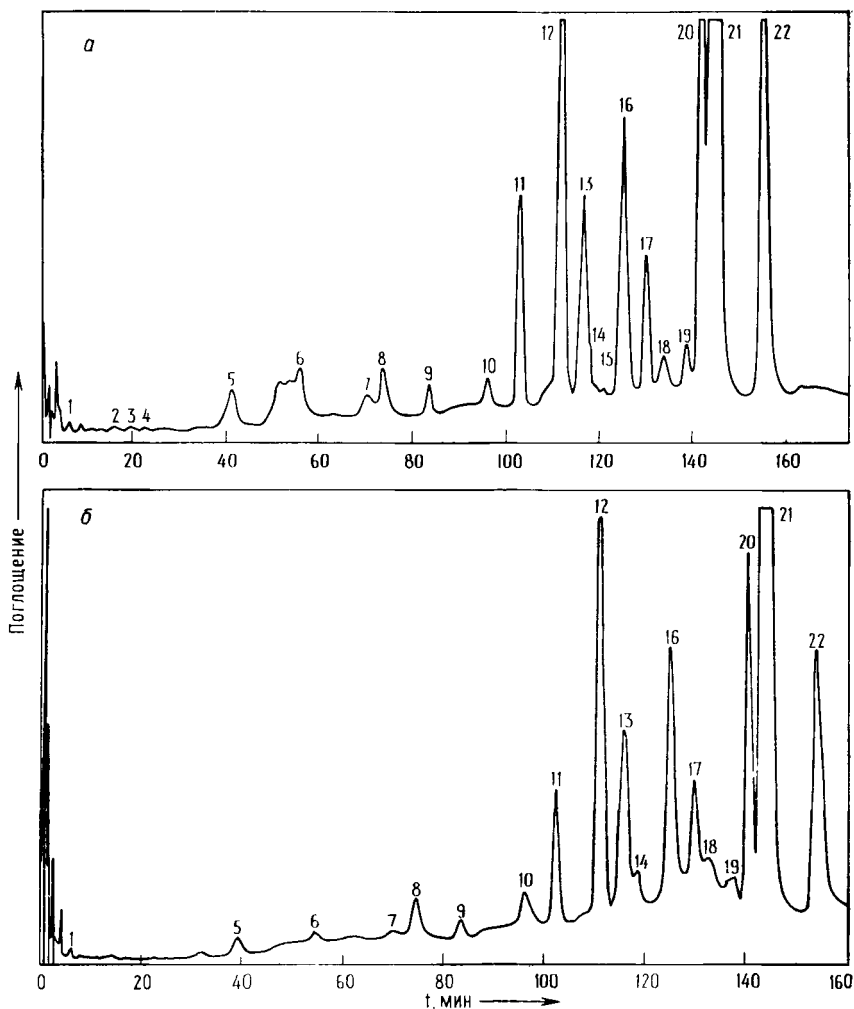


Рис. 9.8. Разделение кислоторастворимых пуриновых и пиримидиновых метаболитов фибробластов здорового человека (а) и страдающего дефицитом гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (б) [41].

Условия разделения см. в подписи к рис. 9.7.

1 — цитидин; 2 — аденозин; 3 — тимин; 4 — урацил; 5 — аденин; 6 — гипоксантин; 7 — никотинамидадениндинуклеотид; 8 — инозин; 9 — цитидин-5'-монофосфат; 10 — аденозин-5'-монофосфат; 11 — уридин-5'-монофосфат; 12 — никотинамидадениндинуклеотидфосфат; 13 — уридиндифосфатгалактоза и цитидин-5'-дифосфат; 14 — гуанозин-5'-монофосфат; 15 — инозин-5'-монофосфат; 16 — аденозин-5'-дифосфат; 17 — уридин-5'-дифосфат; 18 — цитидин-5'-трифосфат; 19 — гуанозин-5'-дифосфат; 20 — уридин-5'-трифосфат; 21 — аденозин-5'-трифосфат; 22 — гуанозин-5'-трифосфат.

водится при 55°C и щелочном рН в линейном градиенте ионной силы и рН и длится 225 мин. Данная система была использована для количественного анализа клеточного пула нуклеотидов.

В литературе описан экспресс-метод для одновременного разделения и количественного анализа аденозин-5'-трифосфата, аденозин-5'-дифосфата и аденозин-5'-монофосфата [43], позволяющий осуществить надежное определение содержания аденинрибонуклеотида в эритроцитах, а также пригодный для многих методов ферментативного анализа, включая анализ пуриновых компонентов.

Авторы работы [44] предложили ВЭЖХ-метод полного отделения рибонуклеозидов от дезоксирибонуклеозидов и от оснований; длительность разделения составляет 30 мин, предел обнаружения 1—5 нг. Элюирование можно проводить при разных значениях рН различными буферными растворами, например фосфатным с 2,5% метанола при рН 6,9 и 3,0 или 50 мМ натрий-боратным, рН 9,0. Варьирование условий элюирования позволяет более четко идентифицировать и количественно определить обычные метаболиты и соответствующие им антиметаболиты. При изократическом элюировании была разделена на отдельные компоненты смесь двадцати метаболитов. Следовательно, в ряде случаев можно отказаться от градиентного элюирования, сопровождаемого при увеличении концентрации буфера-элюента дрейфом нулевой линии, особенно заметным в таких ситуациях, когда детектор работает на максимальной чувствительности, необходимой для определения содержания метаболитов. Данный метод потенциально пригоден для количественного анализа метаболитов и антиметаболитов плазмы крови, например 1-β-D-арабинофуранозилцитозина, арабинофуранозилурацила и фторопиримидина [44], причем без какого-либо предварительного обогащения или предварительной обработки плазмы, что экономит время и уменьшает вероятность потери или разрушения анализируемых соединений. Наличие примесей эндогенных продуктов не влияет на разделение, идентификацию и количественное определение метаболитов в плазме. Соответствующие хроматографические колонки надежны в эксплуатации и сохраняют стабильность в течение нескольких месяцев. Выбранные хроматографические условия позволяют свести до минимума влияние нормальных метаболитов на количественное определение пиримидиновых антиметаболитов.

Концентрации нуклеозидов и оснований в сыворотке крови человека соответствуют их пределу обнаружения, поэтому контроль за изменением их содержания в такой физиологически важной жидкости может быть использован для построения профиля нуклеозидов и азотистых оснований и для изучения их изменения при различных заболеваниях, в том числе опухолевых. Очевидно, что для этого прежде всего необходимо распо-

лагать данными о составе и концентрации нуклеозидов и оснований у здоровых людей и их возможных изменениях в зависимости от пола, возраста, диеты и т. д. Кроме того, необходимо установить влияние условий подготовки образца к разделению на стабильность его компонентов. Только после проведения указанных предварительных исследований можно приступить к сравнительному изучению состава сыворотки крови пациентов с различного типа злокачественными опухолями и здоровых людей. ВЭЖХ на обращенных фазах использовалась для исследования концентрационных кривых низкомолекулярных соединений, поглощающих в УФ-области. Описанные в этой работе методы обнаружения позволили идентифицировать пикомолярные количества нуклеозидов, оснований и других соединений в нескольких микролитрах ультрафильтрата сыворотки. Хроматограммы проб сыворотки крови 31 здорового человека (17 мужчин и 14 женщин) очень схожи. В сыворотке здоровых людей идентифицировано и количественно определено 12 соединений. Данные анализа сыворотки 150 пациентов с различными типами опухолей и другими болезнями показывают, что концентрационные профили существенно отличаются от таковых, полученных для здоровых людей.

Авторами работы [46] предложен скоростной метод разделения (и выделения), идентификации и определения содержания пириимидиновых оснований и нуклеозидов мочи при помощи ВЭЖХ. На первой стадии эти соединения выделяют из мочи, используя небольшую сменную ионообменную колонку. Далее проводят разделение по методу ВЭЖХ на колонке с силикагелем при элюировании смесью метиленхлорида, метанола и 1 М водного раствора формиата аммония. Обнаружение осуществляют при 254 и 280 нм, а для идентификации используют отношение сигналов и величины удерживаемых объемов. Предел обнаружения составляет 0,2 нг урацила и 2,2 нг цитидина. Диапазон линейности для добавленных в мочу тимина, урацила, уридина, псевдоуридина, оротовой кислоты и оротина соответствует 1000-кратному изменению их концентрации. Метод пригоден для диагностирования врожденных нарушений цикла мочевины.

Применение ВЭЖХ на обращенной фазе с целью аналитического определения нуклеозидов и оснований в плазме человека рассмотрено в работе [47]. Авторы этой работы предлагают вначале разделить при помощи ВЭЖХ исследуемую пробу на ряд фракций, каждая из которых содержит по одному из представляющих интерес компонентов, и провести разделение полученных фракций также методом ВЭЖХ. Этот метод позволяет определять нанограммовые количества соединений. Элюирование осуществляется в изократическом режиме с использованием летучего растворителя, что позволяет автоматизировать отбор проб или их лиофилизацию.

9.3.3. Модифицированные компоненты ДНК и РНК

В основе механизма действия алкилирующих мутагенных и канцерогенных агентов лежит их ковалентное связывание с ДНК. Замещение алкилирующими агентами может происходить в пятнадцати различных точках нуклеофильных азотистых оснований и фосфодиэфирного скелета ДНК. Как показали исследования, мутагенной или канцерогенной активностью обладают лишь некоторые продукты алкилирования ДНК. Например, O^6 -алкилгуанины играют активную роль в этих процессах, тогда как 7-алкилгуанины в них не участвуют. О других продуктах алкилирования ДНК, особенно недавно открытых O -алкилпиримидинах, известно гораздо меньше, что отчасти обусловлено отсутствием эффективных и доступных методов разложения и фракционирования алкилированных форм ДНК. Однако, как показали авторы работ [48—51], некоторые из продуктов алкилирования оснований и фосфотриэфиров можно разделить при помощи ВЭЖХ, и этот метод можно с успехом использовать для анализа гидролизатов ДНК (рис. 9.9).

В работе [52] описаны хорошо воспроизводимые методы анализа всех известных метилированных или этилированных производных индивидуальной ДНК. Продукты химического и ферментативного разложения фракционируют путем объединения двух ВЭЖХ-систем, позволяющих осуществлять количественное определение таких продуктов метилирования или этилирования ДНК, как 1-, 3- и 7-алкиладенины, O^2 -алкилцитозины, 3-, O^6 - и 7-алкилгуанины и O^2 -, 3- и O^4 -алкилтимины. N^6 -Алкиладенины, 1-алкилгуанины и N^2 -алкилгуанины обнаружены не были, 3-алкилцитозины были идентифицированы, но не определены количественно. Содержание фосфотриэфиров было установлено исходя из количества алкилфосфотриэфиров тимидил-3'-5'-тимидина. Данный метод позволил определить 98, 81, 98 и 92% алкильных групп, связанных с ДНК и полученных путем реакции ДНК с ^{14}C -метилметансульфонатом, 3H -этилметансульфонатом, N - $[^3H]$ -метил- N -нитрозмочевиной и N - $[^{14}C]$ -этилнитрозмочевиной соответственно.

Большинство молекул ДНК содержат незначительное количество оснований (минорных оснований), которые метилируются после репликации ДНК. Для прокариот и некоторых беспозвоночных эукариот такими минорными основаниями являются 5-метилцитозин и (или) N^6 -метиладенин. Во всех исследованных ДНК позвоночных животных и высших растений обнаружено только одно минорное основание — 5-метилцитозин. Его содержание в насекомых и бактериях составляет менее 0,05 моль. % общего содержания оснований, а в ДНК высших растений достигает 7 мол. %.

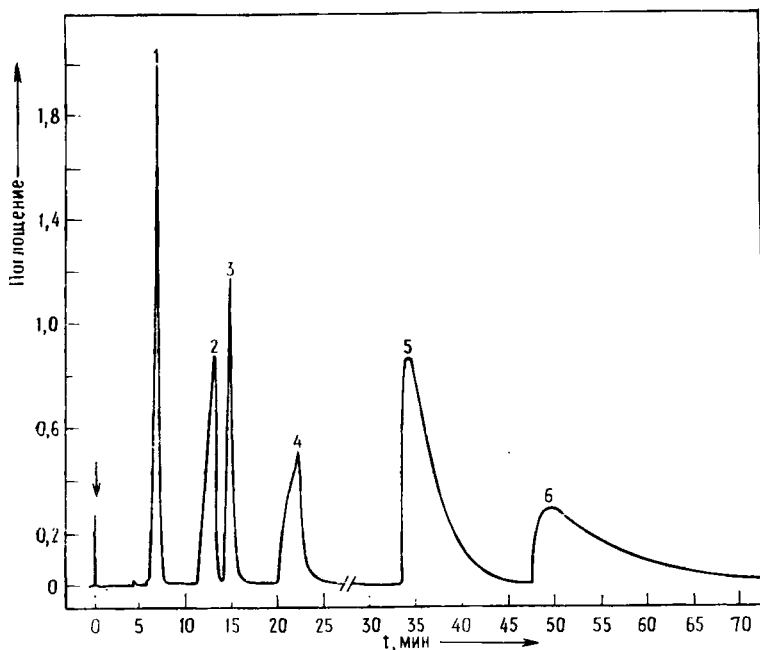


Рис. 9.9. Разделение пуринов [51].

Колонка: $250 \times 0,4$ мм; неподвижная фаза: партисил 10 SCX; элюент: 30 мМ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (рН 4,6); температура: 25°C ; объемная скорость: 1,2 мл/мин (6,42 МПа) в первые 27 мин и последующее увеличение до 2,1 мл/мин (10,86 МПа); обнаружение: при 254 нм. 1 — гуанин; 2 — 7-метилгуанин; 3 — аденин; 4 — O^6 -метилгуанин; 5 — 1-метиладенин; 6 — 3-метиладенин.

ДНК млекопитающих обычно содержит от 0,5 до 1,5 мол. % 5-метилцитозина. Для определения содержания доминирующих и минорных оснований и их общего содержания в ДНК предложен ряд аналитических хроматографических методик, в том числе обращенно-фазовая хроматография [9] и ион-парная хроматография на обращенной фазе [53]. В работе [54] предложен метод определения всех шести дезоксирибонуклеозидов, не требующий проведения гидролиза в жестких условиях, больших проб ДНК, сложной предварительной подготовки пробы или введения метки в ДНК *in vivo*. Этот метод отличается высокой чувствительностью, селективностью, точностью и воспроизводимостью; он пригоден для исследования различных видов ДНК, субфракций ДНК и для выяснения функций метилированной ДНК. Пробы ДНК количественно гидролизуются ДНКазой I, нуклеазой Р1 и бактериальной щелочной фосфатазой. Полученные дезоксирибонуклеозиды используют непосредственно для разделения при помощи ВЭЖХ на обращенной фазе (70 мин), обнаружение осуществляют по поглощению при 254 и 280 нм.

Высокочувствительное и селективное количественное определение при двух длинах волн значительно повышает точность и надежность результатов. РНК гидролизуеться одновременно с ДНК, однако это не влияет на результаты анализа благодаря высокой разрешающей способности хроматографического метода. В указанной работе описано количественное определение 5-метилцитозина в 5 мкг препарата ДНК из тимуса теленка и из молока лосося, причем в последнем случае содержание 5-метилцитозина в ДНК не превышало 1—2%.

Обращенно-фазовая хроматография и ион-парная хроматография на обращенной фазе были использованы для определения 5-алкилурацила в присутствии пуриновых оснований (в основном аденина) в гидролизатах ДНК, полученной путем ферментативного синтеза [55]. С целью упрощения анализа и сокращения его длительности было изучено влияние ионной силы, pH, концентрации ион-парного реагента и метанола в элюенте на селективность разделения алкилурацила и пуриновых оснований. В результате проведенной работы были установлены оптимальные условия разделения в изократическом режиме различных смесей, получаемых гидролизом продуктов ферментативного синтеза.

Авторы работы [56] изучали влияние на разделение нативных и модифицированных нуклеозидов на колонке с обращенной фазой бондапак C_{18} ряда хроматографических параметров и в итоге разработали методику, позволившую разделить за один хроматографический цикл восемнадцать нуклеозидов. Авторы данной работы рассмотрели, в частности, влияние на разделение объемной скорости подвижной фазы, pH, концентрации метанола в элюенте, температуры колонки и объема вводимой пробы. Каждый из этих параметров изучался отдельно с тем, чтобы выявить его влияние на хроматографическое поведение нуклеозидов. Исходя из установленного влияния перечисленных параметров на элюирование нуклеозидов, можно предсказать, как будет проходить их разделение. Проведенные исследования позволили оптимизировать разделение нуклеозидов мочи в изократическом и градиентном режимах.

Для разделения нуклеозидов из гидролизатов тРНК более удобно ступенчатое градиентное элюирование, поскольку при этом происходит полное разделение исходных рибо- и дезоксирибонуклеозидов. Очень важное значение имеет исследование влияния условий на процесс разделения нуклеозидов при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Проведенные исследования показали, что условия разделения нуклеозидов можно варьировать, исходя из установленных корреляций. Данный хроматографический метод имеет особенно важное значение при определении точного состава тРНК, особенно при исследовании биосинтеза тРНК, ее функций, последовательности, а также при

установлении степени чистоты выделяемых РНК и ДНК и исследовании ДНК и ее модификаций.

В работе [57] опубликован метод количественного анализа основных и модифицированных оснований в нефракционированной тРНК печени крысы. тРНК гидролизуют хлорной кислотой и полученные свободные основания разделяют при помощи ВЭЖХ. Селективное обнаружение оснований в гидролизатах тРНК осуществляют при длинах волн, близких к их максимумам поглощения в УФ-области. Выход индивидуальных оснований составляет 80—100%. Данные о составе тРНК печени крысы, т. е. наименования десяти обнаруженных оснований и их содержание, соответствуют полученным при помощи других методов.

Авторами работы [58] предложен весьма несложный метод, особенно удобный для исследований структуры тРНК, ее функции и биосинтеза, а также для определения основных и модифицированных нуклеозидов в составе тРНК. Этот метод имеет высокую чувствительность (нанограммовый уровень), высокую разрешающую способность и селективность и позволяет непосредственно проводить точное и надежное измерение содержания нуклеозидов. Анализируемая проба не разрушается. Предложенная хроматографическая система отличается высокой эффективностью, выделенные очищенные нуклеозиды могут быть использованы для их последующего исследования. Длительность разделения невелика (после гидролиза исследуемого образца до нуклеозидов составляет около 1 ч). Для количественного обнаружения не требуется введения радиоактивной метки, хотя данный метод допускает разделение и обнаружение этих производных.

Предложен количественный метод определения положения и относительного содержания радиоактивного изотопа в меченых нуклеиновых кислотах [59], основанный на совместном применении ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Для анализа достаточно около 1 мкг РНК. Чтобы сделать метод пригодным для исследования нуклеиновых кислот, была проведена оптимизация условий кислотного гидролиза тРНК с целью получения количественного выхода оснований (без их расщепления), а также были подобраны соответствующие условия разделения оснований при помощи ВЭЖХ. Этим методом были исследованы три препарата тРНК, в состав которых введены *in vivo* [$^{13}\text{C}_2$]-аденин, [$^{13}\text{C}_2$]-урацил и [^{13}C]-метильная группа метионина. На основании данных масс-спектрометрического анализа азотистых оснований этих препаратов тРНК было установлено, что в их состав входит 27% аденина, имеющего ^{13}C -атомы в положении 2,43% урацила (^{13}C -2), 45% цитозина (^{13}C -2), 56,9% тимина ^{13}C (С-атомы находились в метильной группе). Относительное же содержание в природной тРНК ^{13}C -атомов составляет 1,08%. Рас-

смотренный метод играет важную роль при изучении механизма биосинтеза нуклеиновых кислот, а также модификации структуры при использовании ЯМР.

Природный модифицированный нуклеозид 3-[3-амино-3-карбокситпропил]-1-метилпсевдоуридин (амф) обнаружен в эукариотической 18S-рРНК (*D. melanogaster*). Это гипермодифицированное основание полностью останавливает процесс элонгации (удлинения) кДНК. Последовательность тРНК амф была определена с помощью дидезоксисиквенирования обратной транскриптазой, последовательность кДНК, кодирующая эту часть 18S-рРНК, определена методом Максама-Гилберта. Оба этих метода в совокупности могут быть использованы для выявления остановки (амф). «Химическое» доказательство существования амф в этой РНК получено с помощью ВЭЖХ нуклеозидов 18S-рРНК из радиоактивно меченных клеток [60]. L-2-[^{14}C]-метионин может использоваться в качестве селективной метки амф в 18S-рРНК эукариот. Анализ с помощью ВЭЖХ позволил определить наличие единичного ^{14}C -меченого нуклеотида в гидролизатах 18S-рРНК. Этот нуклеотид находится в РНК-последовательности, несущей сигнал для остановки синтеза кДНК, так как рестрикционный фрагмент, гибридизующийся с этой последовательностью, предохраняет модифицированное основание от расщепления РНКазой T1.

9.3.4. Цитозинарабиноза и метаболиты

При осуществлении контроля за эффективностью лекарственных средств при проведении курса лечения или исследовательских работ необходима информация о концентрации лекарственных средств, распределении их в тканях и устойчивости образующихся метаболитов. Такая информация позволяет подобрать необходимые дозы лекарственных средств и их интра- и интервариации у пациентов. 1- β -D-Арабинофуранозилцитидин представляет собой аналог пиримидинового нуклеозида и является компонентом некоторых терапевтических наркотических препаратов. В организме А-С образует активный метаболит А-С-трифосфат и неактивный метаболит 1- β -D-урациларабинозид. ВЭЖХ позволяет осуществлять оперативный контроль за содержанием А-С и его метаболитов в биологических тканях. Следует, однако, учитывать, что хроматографическому определению арабинозонуклеозидных аналогов в биологических объектах мешают природные нуклеозиды и нуклеотиды. Поэтому ранее в А-С вводили радиоактивную метку и для обнаружения после хроматографического разделения использовали жидкостные сцинтилляционные счетчики. Метод требовал больших затрат времени, был дорог, и, кроме того, из-за радиоактивности А-С его применение с целью получения фармакокинетической инфор-

мации было ограничено. Позднее были предложены два новых ВЭЖХ-метода разделения и количественного анализа А-С и его метаболитов в биологических тканях [61]. В одном из них изократическое отделение арабинозосодержащих аналогов от всех мешающих соединений проводилось на анионообменной смоле аминекс, содержащей четвертичные аммониевые ионы. Во втором методе разделение проводится на боралкилзамещенной смоле, селективно удерживающей цитозин, уридин и другие *цис*-диолы и не удерживающей арабинозопроизводные, которые затем легко разделяются количественно на колонке с обращенной фазой C_{18} . Эти методы были использованы для установления уровня лекарственных средств в сыворотке крови и моче мышей, а также в опухолевых клетках мышей. Элюирование и в том, и в другом случае велось в изократическом режиме, что снижало до минимума дрейф нулевой линии и поэтому позволяло обнаруживать нанограммовые количества А-С и его метаболитов. На анионнообменных смолах (А-27 и А-29) проводят разделение и количественный анализ А-С, А-У и А-СТР непосредственно в биологических тканях; процедура эта длится менее 40 мин. Количественное определение А-С и А-У проводят также на колонке с обращенной фазой C_{18} после предварительной обработки препаратов посредством аффинной хроматографии на боратзамещенном геле. Применение обращенной фазы позволяет снизить стоимость и сократить длительность анализа (А-С и А-У элюируются в течение 20 мин), повысить его чувствительность. Этот метод разделения получил поэтому более широкое распространение в клинической лабораторной практике, чем метод ИОХ.

ВЭЖХ используют для определения антинеопластического агента цитарабина и его основного метаболита урациларабинозида в плазме крови человека и спинномозговой жидкости [62]. Полное отделение от эндогенных компонентов достигается на обращенной фазе при изократическом элюировании фосфатным буферным раствором (0,05 М, рН 7,0). Предел обнаружения составляет 50 нг/мл, относительная ошибка — менее 10%. Этот простой, оперативный и селективный метод, как показали исследования, пригоден и для фармакокинетических исследований и осуществления клинического контроля.

9.3.5. Модифицированные адениннуклеозиды

В работе [63] опубликован быстрый, чувствительный и специфический метод определения 5'-метилтиоаденозина в биологических пробах. Разделению проб на партисиле 10 SCX предшествует их двухстадийная хроматографическая обработка на дауэксе-50 (H^+ -форма) и геле борной кислоты. Выход соединения количественный, методика разделения проста и дает хо-

рошо воспроизводимые результаты. В работе [64] описана идентификация природных модифицированных адениннуклеозидов (и 3'-О-метиладенозина) при помощи ВЭЖХ, условия проведения которой подобраны так, чтобы сделать возможным разделение большинства нуклеозидов. В основу идентификации положен метод ферментативного сдвига пика: определяется время удерживания и пробы, и продукта N⁶-дезаминирования, полученного после инкубирования пробы с ферментом аденозиндезаминазой.

9.3.6. 5-Фторурацил и 5-фтор-2'-дезоксинуридин

Биохимическая роль 5-фторурацила и его нуклеозидов и нуклеотидов освещена в обзоре [65]. Для разделения 5-фторурацила, его дезоксирибо- и рибонуклеозидов и нуклеотидов используется жидкостная обращенно-фазовая хроматография [66]. Основания и нуклеозиды легко отделяются от их природных аналогов на ODS-фазе при элюировании 20 mM KН₂РO₄ (pH 5,0), содержащим 5 об. % метанола. Этот метод пригоден для определения 5-фтор-2'-дезоксинуридина в сыворотке крови, где его концентрация составляет примерно 0,1 мкг/мл. Добавки в элюент небольших количеств тетрабутиламмонийфосфата (10⁻³ M) приводят к значительному увеличению времени удерживания нуклеотидов, тогда как коэффициенты емкости оснований и нуклеозидов остаются неизменными. Исследование влияния концентрации тетрабутиламмонийфосфата и аммонийфосфата, а также pH элюента показало, что четвертичные аммониевые основания абсорбируются силикагелем с привитыми октадецильными группами, а нуклеотиды, вероятно, удерживаются в результате образования ионных пар с тетрабутиламмониевыми ионами.

В работах [67—71] описаны методы контроля с использованием ВЭЖХ за содержанием 5-фторурацила в плазме на уровне микромолярных и более высоких концентраций. Хотя приведенные методы отличаются от предложенных ранее микробиологических или газохроматографических методов большей чувствительностью и (или) специфичностью, тем не менее пригодность их для фармакокинетических исследований (предусматривающих контроль концентраций 5-фторурацила) ограничена, если необходимы такие процедуры, как непрерывное внутривенное вливание, вливание в печеночную артерию, перитонеальный диализ. В таких случаях точный контроль за концентрацией лекарственных средств необходимо вести в диапазоне 0,1—1,0 M.

Известен специфический и чувствительный метод определения с помощью ВЭЖХ 5-фторурацила и 5-фтордезоксинуридина в плазме крови человека в концентрации около 50 нМ [27]. В качестве внутренних стандартов в этом методе используют

триций-меченые 5-фторурацил и 5-фтордезоксисуридин. Фторпиримидины выделяют из плазмы крови с помощью анионообменной хроматографии и экстрагируют этилацетатом, экстракт упаривают досуха и 5-фторурацил и 5-фтордезоксисуридин разделяют на полупрепаративной колонке (бондапак C_{18}). Метод является специфичным и достаточно чувствительным для определения концентраций 5-фторурацила в плазме, меньших чем 1 мкМ (для таких ситуаций, когда проводится вливание в печеночную артерию или перитонеальный диализ).

9.4. Разделение олиго- и полинуклеотидов

9.4.1. Олигонуклеотиды

Тринуклеозиддифосфаты являются ценным средством исследования процессов биосинтеза белков. Их применяли при расшифровке генетического кода, для исследования вторичной структуры тРНК и 5S-рРНК, а также для изучения специфичности связывания олигонуклеотидов с фактором иницирования трансляции IF3. Тринуклеозиддифосфаты были получены путем ферментативного синтеза и по традиции выделены с помощью анионообменной хроматографии. Процедура выделения обычно состояла из элюирования в течение ночи в градиенте концентрации соли с последующим вымыванием соли в течение еще одного дня. Для того, чтобы упростить методику и сократить время выделения, было предложено использовать обращенно-фазовую хроматографию на пористом микрогранулированном силикагеле с привитыми ODS-группами депротенизированных реакционных смесей при элюировании в градиенте с увеличивающейся концентрацией метанола [73]. Применение этого метода позволило полностью отделить все 16 нуклеозидмонофосфатов друг от друга, а также от тринуклеозиддифосфатов и побочных продуктов синтеза.

Олигоаденилаты, отличающиеся по типу 3'-конца (A_nA , A_nA_p и $A_nA>p$, олигоаденилаты, не имеющие фосфатной группы на 3'-конце, 2', 3'-монофосфаты и 2', 3'-циклические фосфаты), разделяют методом ВЭЖХ на колонке с RP C5, а в последнее время на sdвоенных колонках [74]. На первой из них происходит отделение A_nA_p и $A_nA>p$ от A_nA , далее в верхней части второй колонки смесь проходит через слой, содержащий бактериальную щелочную фосфатазу, осуществляющую конверсию A_nA_p в A_nA . Следовательно, A_nA выходит отдельно от исходных A_nA и $A_nA>p$. Метод может быть использован для определения состава трехкомпонентной смеси, имеющей компоненты с одинаковой длиной цепи, или смеси компонентов с разной длиной цепи, когда $n=3-7$ (A_nA_p и $A_nA>p$). Наличие поли-(U) не влияет на результаты анализа.

Разделение олигорибонуклеотидов адениловой, цитидиловой и уридиновой кислот проводят на колонках с лихросорбом RP-8, RP-18 и лихросорбом диолом, а также на колонке с недавно синтезированным анионообменником диметиламиносиликагелем (DMA-силикагель) [75]. Если разделение проводили на колонках с лихросорбом RP-8 и RP-18 при элюировании водными буферными растворами (K_2HPO_4/H_3PO_4), время удерживания олигонуклеотидов увеличивалось с уменьшением числа нуклеотидных звеньев, т. е. с увеличением гидрофобности олигонуклеотидов. Элюирование олигонуклеотидов на лихросорбе диол происходило в той же последовательности, однако это вызвано тем, что разделение осуществляется по принципу ГПХ. Предполагается, что разделение олигонуклеотидов на DMA-силикагеле происходит за счет электростатического взаимодействия между заряженными группами разделяемых веществ и неподвижной фазы. Обсуждался вклад ионного и молекулярного взаимодействий в удерживание разделяемых веществ.

Для разделения и очистки сложных смесей олигорибонуклеотидов разработан метод [76], в котором используют колонки с тонкодисперсным пористым силикагелевым носителем с привитыми октадецилсилильными группами. Элюирование осуществляют в градиенте ацетонитрил/вода/ацетат аммония. Время разделения составляет 5—15 мин с ошибкой по абсолютному времени удерживания менее 1% и по относительному — примерно 0,1%. На одной колонке разделяют смесь, состоящую из мононуклеозидов, мононуклеотидов и высших олигомеров (до 20-меров). Предел обнаружения оснований составляет ~ 1 пмоль (в большинстве случаев ~ 1 нмоль). При совпадении обстоятельств можно использовать аналитические колонки для очистки ~ 1 мг олигонуклеотида (в течение одного анализа длительностью 10—30 мин).

9.4.2. Олигонуклеотиды с изомерными последовательностями

Короткие олигонуклеотиды из ДНК и РНК были разделены в соответствии с составом их азотистых оснований на анионообменной ВЭЖХ-колонке с партисилом-10 АХ при элюировании триэтиламмонийацетатным буфером [77]. Таким способом удалось разделить пятнадцать из шестнадцати дезокси-нуклеозид-монофосфатов (рис. 9.10) и все шестнадцать динуклеозид-монофосфатов (рис. 9.11).

Этим же методом успешно разделены пары изомерных нуклеотидов; так, например, коммерческий препарат дезоксидинуклеотидов разделен на 13 фракций. Хорошее разрешение получено при разделении дезокситринуклеозиддифосфатов, являю-

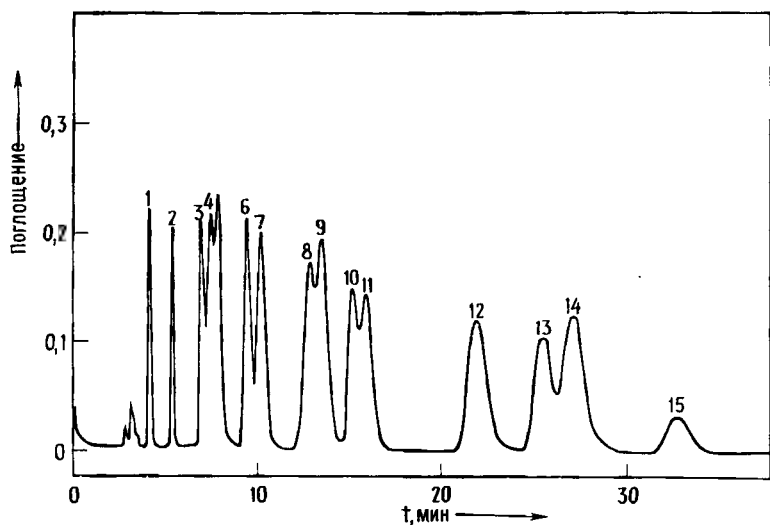


Рис. 9.10. Разделение дезоксирибонуклеозидмонофосфатов [77].

Колонка: 500×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партия 10 SAX; элюент: 10 мМ триэтиламинный ацетат (рН 3,1); температура: 60 °С; обнаружение: при 260 нм.
 1 — (dC)₂; 2 — d(A—C); 3 — d(T—C); 4 — d(C—T); 5 — d(G—C); 6 — d(C—G); 7 — (dA)₂; 8 — d(T—A); 9 — d(A—T); 10 — d(G—A); 11 — d(A—G); 12 — (dT)₂; 13 — d(G—T); 14 — d(T—G); 15 — (dG)₂.

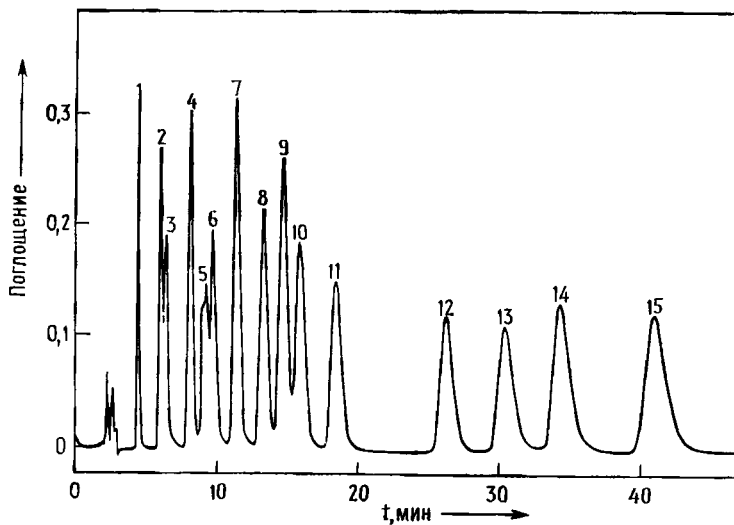


Рис. 9.11. Разделение динуклеозидмонофосфатов [77].

1 — (C)₂; 2 — A—C; 3 — C—A; 4 — U—C; 5 — C—U и (A)₂; 6 — G—C; 7 — C—G; 8 — U—A; 9 — A—U; 10 — G—A; 11 — A—G; 12 — (U)₂; 13 — G—U; 14 — U—G; 15 — (G)₂.

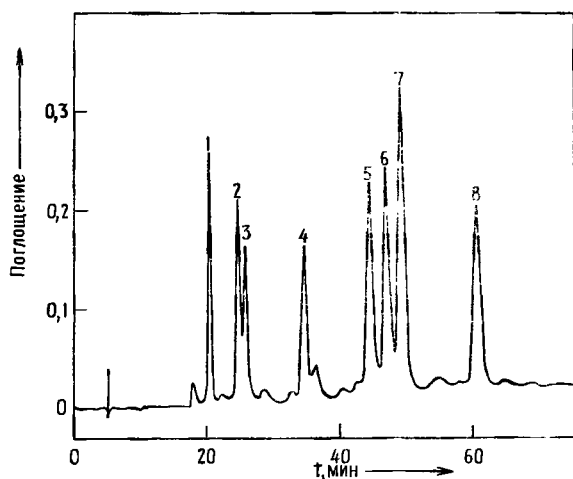


Рис. 9.12. Разделение тринуклеозиддифосфатов, выделенных из продуктов деструкции РНК щелочной фосфатазой и панкреатической РНКазой [77].

Клонка: 500×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил 10 SAX; элюент: от 30 мМ (рН 3,1) до 400 мМ (рН 3,4) триметиламмонийацетата, линейный градиент, 80 мин; температура: 60 °С; обнаружение: при 260 нм.

1—A—A—C; 2—G—A—C; 3—A—G—C; 4—A—A—U; 5—G—G—C; 6—G—A—U; 7—A—G—U; 8—G—G—U.

щихся продуктами разложения ДНК тимуса телят ДНКазой I, активированной Mg^{2+} -щелочной фосфатазой (рис. 9.12).

Известны примеры полного разделения большого числа олигонуклеотидов, имеющих изомерные последовательности. Последовательность оснований в индивидуальных компонентах смеси после разделения определяли путем их гидролиза препаратом змеиного яда и фосфодиэстеразы селезенки и последующего ВЭЖХ-разделения продуктов (нуклеотидов). Восемь тринуклеозиддифосфатов, выделенных из продуктов деструкции РНК щелочной фосфатазой и панкреатической РНКазой, были также разделены в соответствии с составом оснований. Описываемый метод отличается быстротой и дает хорошее разделение. Большинство изомеров были разделены. Более того, триэтиламмонийацетат, применяемый для элюирования, может быть легко удален из элюата методом лиофильной сушки, что облегчает дальнейший анализ последовательности элюируемых веществ. Порядок элюирования изомеров подчиняется правилам, которые будут обсуждены ниже.

Короткие фрагменты ДНК с идентифицированной структурой, которые находят широкое применение в генной инженерии, обычно получают путем сложного синтеза. Альтернативная возможность (на примере 150 фрагментов ДНК), предложенная в работах [78, 79], состоит в следующем. Путем частичного гидро-

лиза легко доступной ДНК проводят препаративное получение смеси гомологичных олигонуклеотидов или пуриновых и пиримидиновых олигонуклеотидов. Далее с помощью комбинирования известных хроматографических методов (ИОХ, ТСХ, бумажная хроматография) фракционируют очень сложный по составу частичный гидролизат ДНК на более простые фрагменты [80—82], которые подвергаются более тонкому хроматографическому разделению на обращенно-фазовой колонке [83, 84]. Как правило, для элюирования используют летучие двухкомпонентные буферные системы: $A \geq 0,1$ М ацетат аммония (рН 7,5), $B \geq 60\%$ метанола, 40% воды. На аналитической колонке с нуклеосилом C_{18} ($11,2 \times 0,46$ см, 7,5 мкм, время разделения 20 мин) выход соответствующих фрагментов ДНК составляет 0,5—3,0 единиц оптической плотности (260 нм). На таком же уровне находится выход и в случае ферментативного синтеза фрагментов генов. Идентификация хроматографических пиков и выбор желаемых олигонуклеотидов среди многих других является сложной задачей и часто дает неоднозначный результат. Методы хроматографии и отпечатков пальцев позволяют, однако, преодолеть указанные трудности, а также определить степень чистоты олигонуклеотидов и их последовательность. Олигонуклеотиды, полученные при хроматографическом разделении гидролизатов ДНК, по своим показателям ни в чем не уступают синтетическим. Недостатком метода является ограниченная возможность получения олигонуклеотидов с заранее заданной последовательностью. Однако следует отметить, что синтетический метод получения олигонуклеотидов гораздо более трудоемок.

9.4.3. Продукты рестрикции ДНК

ВЭЖХ (RP C-5, рН 12) использовали для препаративного разделения коротких фрагментов комплементарных цепей ДНК, полученных в результате действия эндонуклеазы рестрикции *Haе III* [85]. Свойства *Haе III*-фрагментов pRZ2ДНК изучали для того, чтобы выяснить, почему некоторые из них связываются на колонке с RP C-5 более прочно, чем можно было ожидать на основании их длины [86]. Очищенные фрагменты анализировали на их нуклеотидный состав, а также с помощью седиментационного анализа в градиенте плотности CsCl или Cs₂SO₄. А-Т-обогащенные фрагменты элюируются при более высоких концентрациях солей, чем фрагменты такой же длины, но не содержащие эквивалентного количества А-Т. Кроме того, исследования по денатурационному картированию, проведенные с помощью электронной микроскопии, показывают, что А-Т-обогащенные фрагменты двигаются иначе, чем G-C-обогащенные, что вызывает увеличение удерживания. Существует по крайней мере еще

один фактор, влияющий на разделение фрагментов рестрикции ДНК на фазе RP C-5. Фрагменты, содержащие связанные регуляторные белки, а также генетические регуляторные участки, элюируются позже, чем можно предположить на основании их размера.

Порозкообразный кель-Ф без какого-либо покрытия обладает рядом уникальных свойств как неподвижная фаза в обращенно-фазовой ВЭЖХ олигонуклеотидов и фрагментов рестрикции ДНК [87]. Вещества элюируются в градиенте ацетонитрила (0—18 об. %) в 0,1 М водном растворе триэтиламонийацетата. В отличие от разделения на RP C-5 олигонуклеотиды не элюируются растворами соли, а порядок элюирования фрагментов рестрикции строго соответствует длине цепи. Кель-Ф представляет собой дешевый и химически инертный материал, хорошо заполняющий колонку. Результаты, полученные на колонках с кель-Ф, отличаются высокой воспроизводимостью. Емкость колонки с кель-Ф меньше, чем с RP C-5, однако выходы разделяемых веществ в первом случае выше (при нанесении микрограммовых количеств пробы выход обычно выше 50%).

9.4.4. Фрагменты РНК

3'-Концевые фрагменты 16S-рРНК *E. coli* выделяли и очищали с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1 SDS-Na, и анионообменной хроматографии на колонке с пермафазой ААХ, что позволило фракционировать смеси как моно-, так и полинуклеотидов (длиной до 80 нуклеотидов) [88]. С помощью ВЭЖХ были разделены низкомолекулярные фрагменты РНК, полученные в результате гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда. Четыре наиболее распространенные нуклеозид-5'фосфаты были идентифицированы по времени их удерживания, а их относительное содержание хорошо коррелировало с составом оснований анализируемого фрагмента. Был осуществлен также анализ продуктов гидролиза РНКазой T1 49-нуклеотидного фрагмента. Получены также УФ-спектр и кривая плавления очищенного фрагмента. Известен метод экспресс-анализа олигонуклеотидов, полученных из модифицированной *rhe* тРНК дрожжей после гидролиза РНКазой T1, осуществляемый с помощью разделения на аминопропилсиликагеле, причем установление фрагментов основывалось на данных нуклеозидного анализа с помощью разделения на C₁₈-силикагеле [89].

9.4.5. тРНК

Для разделения аминоацил-тРНК и незаряженных тРНК (животных или бактериальных) использовали неподвижную фазу на основе полихлортрифторэтилена с нанесенным фенолборатом.

Таблица 9.1. Наблюдаемые времена удерживания азотистых оснований, нуклеотидов, нуклеозидов и их метаболитов^a [32]^a

Соединение	Время удерживания, мин	Соединение	Время удерживания, мин
Цитозии	2,28	Цитидин	5,85
Уридиндифосфоглюкоза	2,35	Рибофлавиин	6,84
Уридинмоиофосфат	2,54	Гипоксантин	7,31
Оротидин	3,25	1-Метилцитидин	7,25
Никотинамидмононуклеотид	3,41	Гуанин	7,56
Мочевая кислота	4,31	Уридин	8,27
Урацил	4,13	Ксантин	8,53
Псевдоуридин	4,31	5-Аминоимидазолкарбок-амидорибозид	8,77
4-Амино-5-имидазолкарбок-амид	4,31	Тимидинмонофосфат	8,89
5-Фторурацил	4,36	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат	8,91
Гуанозинмонофосфат	4,52	Тимин	9,30
Ксантозинмонофосфат	4,75	7-Метилинозин	9,46
Адепозинмоиофосфат	5,04	2'-Дезоксигуанизин	16,86
1-Метиладенин	5,77	2'-Дезокситимидин	17,29
Адеозиндифосфат	9,53	1-Метилинозин	18,22
Флавинадениндинуклеотид	9,98	6-Метилпурин	18,98
α -Никотинамидадениндинуклеотид	10,15	2-Метиладенин	19,13
Аденозин-5'-дифосфорибоза	10,26	N ¹ -Метилгуанозин	19,22
Аллопуринол	10,52	Индолил-3-молочная кислота	19,28
7-Метилксантозин	10,69	Пуририбозид	19,69
3',5'-Циклоцитидинмонофосфат	10,76	Туберцидин	19,73
5-Метилцитидин	10,79	7-Метиладенин	19,92
Пурии	11,20	N ² -Метилгуанозин	20,23
Антраиловая кислота	11,23	Кинуреновая кислота	20,80
7-Метилгуанозин	11,82	Аденозин	21,77
Пиримидин	11,92	Индолил-3-уксусная кислота	21,99
Ксантозин	12,40	5-Метилпиримидин	23,23
Никотинамид	12,55	3',5'-Циклоаденозинмонофосфат	23,47
3',5'-Циклоуридинмонофосфат	12,86	2'-Дезоксиаденозин	23,55
β -Никотинамидадениндинуклеотид	13,00	N ² ,N ² -Диметилгуанозин	24,42
Инозин	13,52	6-Метиладенин	24,90
Аденин	13,54	Теофиллин	27,20
Гуанозин	14,40	Флавиинмононуклеотид	27,58
7-Метилгуанин	14,65	Дифиллин	29,11
3',5'-Циклогуанозинмонофосфат	15,12	6-Метиладенозин	30,86
N ² -Метилгуанин	15,22	Индолил-3-ацетамид	31,41
2'-Дезоксиинозин	15,29	Индолил-3-пропионовая кислота	34,66
3',5'-Циклоинозинмонофосфат	15,92	Кофеин	35,08
Гиппуровая кислота	15,98	3-Индолилантаириловая кислота	41,11

^a Неподвижная фаза: обращенная фаза C₁₈, привитая к пористому силикагелю (10 мкм); проба: 40 мкл раствора с концентрацией 10⁻⁵ моль/л каждого стандарта; элюент: от 0,02 М КН₂РO₄, рН 5,6, до 60% метанола, 0,69%/мин (от 0 до 60%-ного метанола за 87 мин), градиент линейный; объемная скорость: 1,5 мл/мин; температура: комнатная.

С помощью этого метода в одну стадию разделяли также О-метилнуклеозиды и рибозоненасыщенные нуклеозиды. Вещества каждой группы, имеющие заместители, не образуют боратных комплексов и не удерживаются на колонке. Образование комплекса между рибофуранозами и боратом облегчается при введении гидрофобного «хвоста» в борат, путем повышения ионной силы элюента, а также за счет придания гидрофобности матрице сорбента, модифицированного боратом. Одностадийный метод очистки тРНК на обращенно-фазовой боратной колонке был проведен на примере нескольких препаратов тРНК, отличающихся по специфичности к гидрофобным или ионным аминокислотам. Степень очистки составила 70—95%, выход 80%. Однако выход по аминоксил-тРНК, содержащей куеновые основания, составил только около 6%.

Описан метод ВЭЖХ разделения изоакцепторных тРНК на колонке со смолой RP C-5 [90], отличающейся высокой воспроизводимостью. Минимум 8000 распадов на пробу необходимо иметь, чтобы осуществить анализ в устройстве с проточной ячейкой для определения числа распадов; для обнаружения же образцов с меньшей радиоактивностью может быть использован жидкостной сцинтилляционный счетчик. Этот метод предложено применять для исследования изменений в тРНК-комплементах из дифференцированных клеток или клеток, выращенных в разных условиях.

9.4.6. Анализ последовательности олигонуклеотидов и РНК

Простой метод анализа последовательности небольших олигонуклеотидов предложен в работе [91]. Он основан на одновременной качественной и количественной идентификации мономеров, полученных в результате гидролиза олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда, после разделения на анионообменной колонке с пермафазой ААХ или на колонке с обращенной фазой RP C-5 [92]. Таким образом была установлена точная последовательность пяти олигомеров: р(ACCUCC), р(CUGUU), р(AGGA), д(ATTACC) и д(GGAAT) [91].

Описан быстрый автоматический метод определения последовательности синтетического дезоксидекануклеотида д(ТАТСААГТТГ) [93], основанный на использовании ВЭЖХ и гидролиза фосфодиэстеразой змеиного яда.

В работе [94] проведена оптимизация условий четкой идентификации, точного количественного анализа и хорошего разделения на ВЭЖХ-колонках с AS-пеллионексом SAX и AL-пеллионексом WAX рибонуклеозидов, моно- и олигорибонуклеотидов, полученных в результате гидролиза полирибонуклеотидов некоторыми рибонуклеазами. РНКазный гидролизат 5S-рРНК

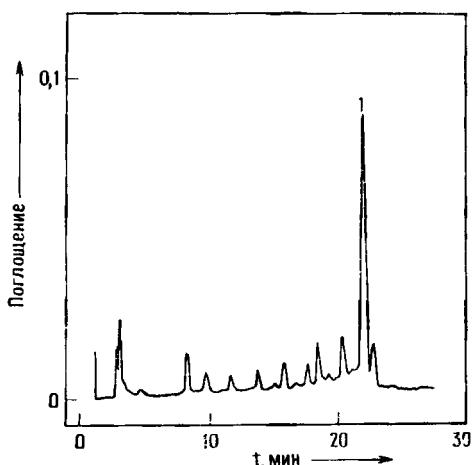


Рис. 9.13. Разделение смеси олигодезоксирибонуклеотидов, содержащей синтетический декамер $\text{д}(\text{C}-\text{C}-\text{G}-\text{A}-\text{T}-\text{A}-\text{T}-\text{C}-\text{G}-\text{G})$ (пик 1) [116].

Колонка: $250 \times 4,6$ мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил SAX; элюент: растворитель А — 1 мМ KH_2PO_4 (рН 6,3) в смеси формамид/ H_2O (60 : 40 по объему), растворитель Б — 300 мМ KH_2PO_4 (рН 6,3) в смеси формамид/ H_2O (60 : 40 по объему), градиент от 0 до 75% Б, 40 мин; объемная скорость: 2 мл/мин, температура: 45°C ; обнаружение: при 280 нм.

дает обычно примерно 15 пиков. Большинство из них соответствуют индивидуальным олигонуклеотидам, но некоторые — двум или более компонентам. Для идентификации олигонуклеотидов, элюируемых одновременно, ВЭЖХ соединяли со скоростным УФ-детектором с перестраиваемой длиной волны, что позволило проводить идентификацию не только по времени удерживания, но и по УФ-спектрам разделяемых веществ. Этим методом удалось установить последовательность различных олигонуклеотидов, полученных в результате полного или частичного гидролиза РНКазой 5S-гРНК печени форели. Метод, основанный на применении ВЭЖХ, более продолжителен и требует большего количества препарата РНК, чем при использовании гель-электрофореза изотопномеченной РНК. Тем не менее по сравнению с традиционными хроматографическими методами он требует в 20 раз меньше времени и материала, а также позволяет идентифицировать модифицированные нуклеотиды по их УФ-спектру (последнее невозможно для электрофоретических методов). Хроматографический метод целесообразно использовать в тех лабораториях, где не поставлены радиоизотопные методы.

9.5. Применение хроматографии в полинуклеотидном синтезе

ВЭЖХ позволяет быстро и эффективно разделять синтетические олигонуклеотиды, являющиеся промежуточными соединениями в ступенчатом или блок-синтезе полинуклеотидов. ВЭЖХ в препаративном варианте значительно сокращает время синтеза

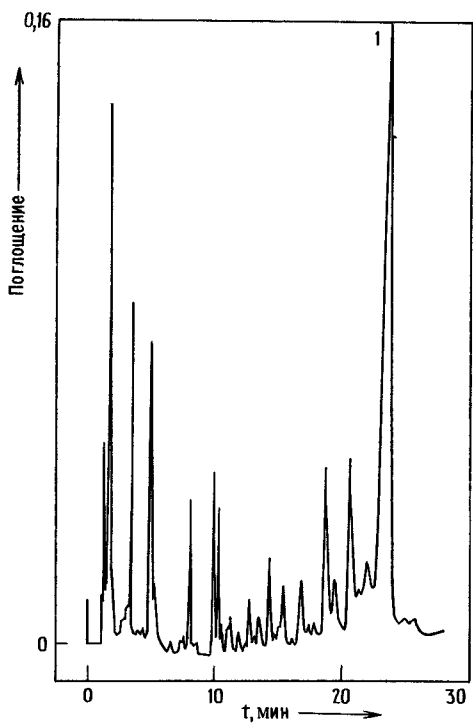


Рис. 9.14. Разделение смеси олигодезоксирибонуклеотидов, содержащей синтетический декамер $d(C-C-G-A-T-A-T-C-G-G)$ [116].

Колонка: $250 \times 4,6$ мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс- NH_2 ; элюент: растворитель А — 10 мМ KH_2PO_4 (рН 4,5), растворитель Б — 900 мМ KH_2PO_4 (рН 4,5); градиент от 0 до 50% растворителя Б, 50 мин; объемная скорость: 2 мл/мин; температура: 60 °С; обнаружение: при 280 нм.

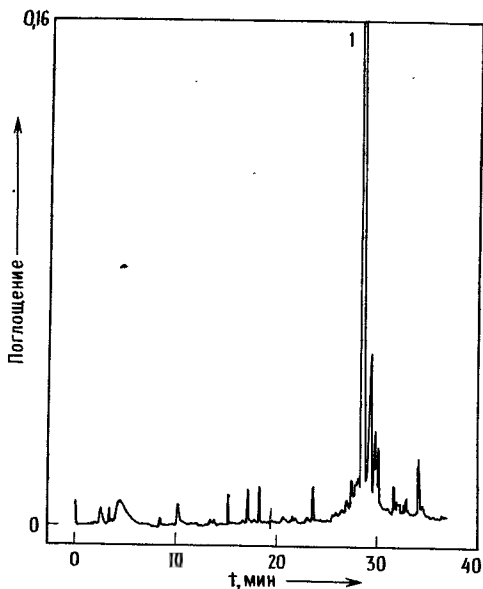


Рис. 9.15. Разделение смеси олигодезоксирибонуклеотидов, содержащей синтетический декамер $d(C-C-G-A-T-A-T-C-G-G)$ [116].

Колонка: $250 \times 4,6$ мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс-ODS; элюент: растворитель А — 10 мМ триэтиламонийацетат (рН 7,0), растворитель Б — 60% ацетонитрила в 10 мМ триэтиламонийацетате (рН 7,0), градиент от 0 до 30% Б, 60 мин; объемная скорость: 2 мл/мин; температура: 45 °С; обнаружение: при 280 нм.

фрагментов ДНК или РНК. Для проведения синтеза олигодезоксирибонуклеотидов требуется получить полностью защищенные фрагменты, а затем снять защиту с аминогрупп нуклеоснований, интернуклеотидных фосфатов и терминальных гидроксигрупп. После снятия защиты олигомеры обычно очищают методом ВЭЖХ на ионообменных и (или) обращенно-фазовых колонках (рис. 9.13, 9.14 и 9.15). В работах [95—114] проведены обширные исследования влияния различных пуриновых и пиримидиновых оснований, защитных групп, фосфатных групп и длины цепи олигонуклеотидов на время удерживания.

При разделении на обращенной фазе трудно предсказать время удерживания конкретных олигомеров по отношению к другим компонентам разделяемой смеси, а также зависимость времени удерживания от длины цепи, хотя в целом этот метод дает хорошие результаты. Для разделения синтетических олигонуклеотидов в качестве нового метода было предложено использовать ГПХ на колонке I-125 (Protein Analysis Waters) [115]. Было изучено влияние pH и молярной концентрации подвижной фазы на разделение олигомеров. Для быстрой и эффективной очистки синтетических олигонуклеотидов после полного снятия защиты целесообразно применять летучие буферные растворы, например на основе триэтиламмонийацетата.

Литература

1. Gere D. R. in: J. J. Kirkland (Ed.): *Modern Practice of Liquid Chromatography*, pp. 417, Wiley, New York, 1971.
2. Holton R. A., Spatz D. M., van Tamelen E. E., Wierenga W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 605 (1974).
3. Brown P. R. in: *High Pressure Liquid Chromatography*, Academic Press, New York, 1973.
4. Demushkin V. P., Plyashkevich G. Y. *Anal. Biochem.*, **84**, 12 (1978).
5. Eksteen R., Kraak J. C., Linssen P. J. *Chromatogr.*, **148**, 413 (1978).
6. Edelson E. H., Lawless J. G., Wehr C. T., Abbott S. R. *J. Chromatogr.*, **174**, 409 (1979).
7. Breter H.-J., Zahn R. K. Z. *Naturforsch.*, **31c**, 551 (1976).
8. Hartwick R. A., Brown P. R. *J. Chromatogr.*, **126**, 679 (1976).
9. Wakizaka A., Kurosaka K., Okuhara E. *J. Chromatogr.*, **162**, 319 (1979).
10. Hartwick R. A., Brown P. R. *J. Chromatogr.*, **143**, 383 (1977).
11. Ko C. Y., Johnson J. L., Barnett L. B., McNair H. M., Vercellotti H. R. *Anal. Biochem.*, **80**, 183 (1977).
12. Cadet J., Voituriez L. *J. Chromatogr.*, **195**, 139 (1980).
13. Szepesi G., Gazdag M., Mezei J. *Pharmazie*, **35**, 602 (1980).
14. Hoffman N. E., Liao J. C. *Anal. Chem.*, **49**, 2231 (1977).
15. Miksic J. R., Brown P. R. *J. Chromatogr.*, **142**, 641 (1977).
16. Pennings E. J. M., van Kempen G. M. J. *J. Chromatogr.*, **176**, 478 (1979).
17. Walseth T. F., Graff F., Moos M. G. Jr., Goldberg N. D. *Anal. Biochem.*, **107**, 240 (1980).
18. Schwenn J. D., Jender H. G. *J. Chromatogr.*, **193**, 285 (1980).
19. Kato Y., Seita T., Hashimoto T., Shimizu A. *J. Chromatogr.*, **134**, 204 (1977).

20. Singhal R. P., Bajai R. K., Buess C. M., Smoll D. B., Vakharia V. N. *Anal. Biochem.*, **109**, 1 (1980).
21. Glad M., Ohlson S., Hansson L., Mansson M.-O., Mosbach K. J. *Chromatogr.*, **200**, 254 (1980).
22. Pfandenbauer E. H., Tong S. D. J. *Chromatogr.*, **162**, 585 (1979).
23. Schott H., неопубликованные результаты.
24. Chow F. K., Grushka E. *Anal. Chem.*, **49**, 1756 (1977).
25. Chow F. K., Grushka E. *Anal. Chem.*, **50**, 1346 (1978).
26. Chow F. K., Grushka E. J. *Chromatogr.*, **185**, 361 (1979).
27. Gehrke C. W., Kuo K. C., Davis G. E., Suits R. D., Waalkes T. P., Borek E. J. *Chromatogr.*, **150**, 455 (1978).
28. Krstulovic A. M., Brown P. R., Rosie D. M. *Anal. Chhem.*, **49**, 2237 (1977).
29. Khym J. X. *Clin. Chem.*, **21**, 1245 (1975).
30. Mckeag M., Brown P. R. J. *Chromatogr.*, **152**, 253 (1978).
31. Svoboda V., Kleinmann I. J. *Chromatogr.*, **176**, 65 (1979).
32. Hartwick R. A., Assenza P. S., Brown P. R. J. *Chromatogr.*, **186**, 647 (1979).
33. Rao G. H. R., White J. G., Jachimowicz A. A., Witkop C. I. J. *Lab. Clin. Med.*, **81**, 839 (1974).
34. Ogura R., Matsuzaki T., Kumano S., Daoud A. H., Griffin C. A., Knox J. M. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2**, 58 (1980).
35. Brenton D. P., Astrin K. H., Cruikshank M. K., Seegmiller J. E. *Biochem. Med.*, **17**, 231 (1977).
36. Maybaum J., Klein F. K., Sadee W. J. *Chromatogr.*, **138**, 149 (1980).
37. Cohen M. B., Maybaum J., Sadee W. J. *Chromatogr.*, **198**, 435 (1980).
38. Anderson F. S., Murphy R. C. J. *Chromatogr.*, **121**, 251 (1976).
39. Bakay B., Nissinen E., Sweetman L. *Anal. Biochem.*, **86**, 65 (1978).
40. Bakay B., Nissinen E., Sweetman L., Francke U., Nyhan W. L. *Pediat. Res.*, **13**, 1365 (1979).
41. Nissien E. *Anal. Biochem.*, **106**, 497 (1980).
42. Floridi A., Palmerini C. A., Finil C. J. *Chromatogr.*, **138**, 203 (1977).
43. Schweinsberg P. D., Loo T. L. J. *Chromatogr.*, **181**, 103 (1980).
44. Rustum Y. M. *Anal. Biochem.*, **90**, 289 (1978).
45. Hartwick R. A., Krstulovic A. M., Brown P. R., J. *Chromatogr.*, **186**, 659 (1979).
46. Evans J. E., Rieckelmann H., Naylor E. W., Guthrie R. J. *Chromatogr.*, **163**, 29 (1979).
47. Taylor G. A., Dady P. J., Harrap K. R. J. *Chromatogr.*, **183**, 421 (1980).
48. Swenson D. H., Lawley P. D. *Biochem. J.*, **171**, 575 (1978).
49. Frel J. V., Swenson D. H., Warren W., Lawley P. D. *Biochem. J.*, **174**, 1031 (1978).
50. Thielmann H. W., *Cancer Lett.*, **6**, 311 (1979).
51. Faustman E. M., Goodman J. I., J. *Pharm. Meth.*, **4**, 305 (1980).
52. Beranek D. T., Weis C. C., Swenson D. H. *Carcinogenesis*, **1**, 595 (1980).
53. Ehrlich M., Ehrlich K. J. *Chromatogr. Sci.*, **17**, 531 (1979).
54. Kuo K. C., McLune R. A., Gehrke C. W. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4763 (1980).
55. Cadrnyi A. H., Vajda M., Ságt J. J. *Chromatogr.*, **204**, 213 (1981).
56. Gehrke C. W., Kuo K. V. J. *Chromatogr.*, **188**, 129 (1980).
57. Essigmann J. M., Busby W. F., Wogan G. N. *Anal. Biochem.*, **81**, 384 (1977).
58. Davis G. E., Gehrke C. W., Kuo K. C. J. *Chromatogr.*, **173**, 281 (1979).
59. Agris P. F., Tompson J. G. J. *Chromatogr.*, **194**, 205 (1980).
60. Youvan D. C., Hearst J. F. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 1723 (1981).
61. Pallavicini M. G., Mazrimas J. A. J. *Chromatogr.*, **183**, 449 (1980).
62. Breithaupt H., Schick J. J. *Chromatogr.*, **225**, 99 (1981).
63. Ragione F. D., Ragosta G., Cacciapouti G., Porcelli M., Carteni-Farina M. *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **56**, 2030 (1980).
64. Ratech H., Thorbecke G. J., Hirschhorn R. J. *Chromatogr.*, **183**, 499 (1980).

65. *Heidelberger C.* Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol., 4, 1 (1965).
66. *Gelijkens C. F., DeLeenheer A. P. J.* Chromatogr., 194, 305 (1980).
67. *MacMillan W. E., Wolberg W. H., Welling P. G.* Cancer Res., 38, 3479 (1978).
68. *Ensminger W. D., Rosowsky A., Raso U., Levin D. C., Glode M., Come S., Steele G., Frei E.* Cancer Res., 38, 3784 (1978).
69. *Sitar D. W., Shaw D. H., Thirlwell M. P., Ruedy J. R.* Cancer Res., 37, 3981 (1977).
70. *Wu A. T., Au J. L., Sadee W.* Cancer Treat. Rep., 63, 210 (1978).
71. *Au J. L., Wu A. T., Friedman M. A., Sadee W.* Cancer Treat. Rep., 63, 343 (1979).
72. *Buckpitt A. R., Boyd M. R.* Anal. Biochem., 106, 432 (1980).
73. *Tyson R. W., Wickstrom E. J.* Chromatogr., 192, 485 (1980).
74. *Usher D. A., Rosen J. A.* Anal. Biochem., 92, 276 (1979).
75. *Jost W., Unger K. K., Lipecky R., Gassen H. G. J.* Chromatogr., 185, 403 (1979).
76. *McFarland G. D., Borer P. N.* Nucleic Acids Res., 7, 1067 (1979).
77. *Dizdaroglu M., Hermes W. J.* Chromatogr., 171, 321 (1979).
78. *Schott H.* Nucleic Acids Symp. Ser. No. 7, 203 (1980).
79. *Schott H., Schrade H.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 9, 187 (1981).
80. *Schott H.* Nucleic Acids Res. Spec. Publ., No. 4, 161 (1978).
81. *Schott H. J.* Chromatogr., 172, 179 (1979).
82. *Schott H., Watzlawick H. J.* Chromatogr., 196, 435 (1980).
83. *Dizdaroglu M., Hermes W., von Sonntag C., Schott H. J.* Chromatogr., 169, 429 (1979).
84. *Dizdaroglu M., Simic M. G., Schott H. J.* Chromatogr., 188, 273 (1980).
85. *Eshaghpour H., Crothers D. M.* Nucleic Acids Res., 5, 13 (1978).
86. *Patient R. K., Hardies S. C., Larson J. E., Inman R. B., Maquat L. E., Wells R. D. J.* Biol. Chem., 254, 5548 (1979).
87. *Usher D. A.* Nucleic Acids Res., 6, 2289 (1979).
88. *Baan R. A., van Charldorp R., van Leerdam E., van Knippenberg P. H., Bosch L., de Rooij J. F. M., van Boom J. H.* FEBS Lett., 71, 351 (1976).
89. *McLaughlin L. W., Cramer F., Sprinzl M.* Anal. Biochem., 112, 60 (1981).
90. *Dion R., Cedergren R. J. J.* Chromatogr., 152, 131 (1978).
91. *van Boom J. H., De Rooij J. F. M. J.* Chromatogr., 131, 169 (1977).
92. *Gillam S., Rottman F., Smith M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 96 (1977).
93. *De Rooij J. F. M., Bloemhoff W., van Boom J. H. J.* Chromatogr., 177, 380 (1979).
94. *Komiya H., Nishikawa K., Ogawa K., Takemura S. J.* Biochem., 86, 1081 (1979).
95. *Fritz H.-J., Belagaje R., Brown E. R., Fritz H. R., Jones R. A., Lees R. G., Khorana H. G.* Biochemistry, 17, 1257 (1978).
96. *Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C.* Nucleic Acids Res., 8, 1081 (1980).
97. *Crea R., Horn T.* Nucleic Acids Res., 8, 2331 (1980).
98. *Teoule R., Derbyshire R., Guy A., Molko D., Roget A.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 7, 23 (1980).
99. *Horn T., Vasser M. P., Struble M. E., Grea R.* Nucleic Acids Symp. Ser. No. 7, 225 (1980).
100. *Norris K. E., Norris F., Brunfeldt K.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 7, 233 (1980).
101. *Gait M. J., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 7, 243 (1980).
102. *Miyoshi K., Itakura K.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 7, 281 (1980).
103. *Chakhmakhcheva O. G., Efimov V. A., Ovchinnikov Yu. A.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 7, 345 (1980).

104. *Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K.* Nucleic Acids Res., **8**, 5507 (1980).
105. *Miyoshi K., Miyake T., Hozumi T., Itakura K.* Nucleic Acids Res., **8**, 5473 (1980).
106. *Markham A. F., Edge M. D., Atkinson T. C., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Newton C. R., Scanlon D.* Nucleic Acids Res., **8**, 5193 (1980).
107. *Hsiung H. M., Sung W. L., Brousseau R., Wu R., Narang S. A.* Nucleic Acids Res., **8**, 5753 (1980).
108. *Wetzel R., Heyneker H. L., Goeddel D. V., Jhurani P., Shapiro J., Crea R., Low T. L. K., McClure J. E., Thurman G. B., Goldstein A. J.* Biochemistry, **19**, 6096 (1980).
109. *Moseman McC. M. I., Gumpert R. I.* Biochemistry, **19**, 635 (1980).
110. *Matteucci M. D., Caruthers M. H.* Tetrahedron Lett., **21**, 719 (1980).
111. *Fourrey J. L., Shire D. J.* Tetrahedron Lett., **22**, 729 (1981).
112. *Ohtsuka E., Takashima H., Ikehara M.* Tetrahedron Lett., **22**, 765 (1981).
113. *Josephson S., Balgobin N., Chattopadhyaya J. B.* Nucleic Acids Symp. Ser., No. 9, 177 (1981).
114. *Duckworth M. L., Gait M. J., Goellet P., Hong G. F., Singh M., Titmas R. C.* Nucleic Acids Res., **9**, 1691 (1981).
115. *Molko D., Derbyshire R., Guy A., Roget A., Teoule R. J.* Chromatogr., **206**, 493 (1981).
116. *McLaghlin L. W., Krusche J. U.*, in: J. G. Gassen, A. Lang (Eds.): Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene-Fragments, p. 177, Verlag Chemie, Weinheim, 1982.

Порфирины

Г. Мейер (H. D. Meyer)

10.1. Введение

Порфирины, в молекулах которых содержится тетрапиррольный макроцикл (рис. 10.1), принимают участие во многих биохимических процессах, и поэтому сами порфирины и их хелатные комплексы с металлами распространены повсеместно. Одна из наиболее широко известных и важных функций порфиринов заключается в контроле реакций биологического окисления и транспорте кислорода. Порфирины участвуют и в ряде других биохимических процессов, например именно благодаря порфинам окрашены перья птиц.

Циклическая структура и наличие лигандных групп в порфинах позволяют им образовывать хелатные комплексы со многими металлами. Комплекс порфина с железом — гем, связанный, как правило, с белковой молекулой, — играет ключевую роль в процессе биологического окисления. Хлорофилл, ответственный за фотосинтез в зеленых растениях, представляет собой магнийсодержащий комплекс порфина.

10.1.1. Биосинтез порфиринов

Порфирин синтезируется индивидуальными живыми организмами. Установлено, что начальные стадии синтеза и интермедиаты порфиринов почти всегда идентичны, хотя конечные продукты могут различаться. В качестве примера на рис. 10.2 показана схема биосинтеза гема. Сукцинил-СоА и глицин образуют первый предшественник гема — δ -аминолевулиновую кислоту, в результате конденсации двух молекул которой образуется монопирролпорфобилиноген — второй предшественник гема. Связывание и последующая циклизация четырех порфобилиногенов приводят к появлению порфириногена — лабильного интермедиата, представляющего собой гексагидропорфирин с четырьмя метиленовыми мостиками между пиррольными кольцами. Порфириногены легко окисляются до индивидуальных порфиринов. Первым из них образуется уропорфириноген. В молекуле этого соединения восемь боковых цепей, четыре из которых — это остатки уксусной, другие четыре — остатки пропионовой кислот.

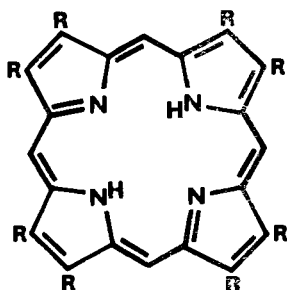


Рис. 10.1. Порфириновый макроцикл.

В данном случае возможно возникновение четырех изомеров, но только два из них являются природными. Эти изомеры отличаются только расположением кислотных групп в D-кольце. Только один из этих изомеров (нормальная форма — изомер III) способен далее превращаться в гем. Превращение протекает следующим образом. Последовательное декарбоксилирование ацетильных групп до метильных приводит через стадии образования промежуточных продуктов к копропорфириногену, содержащему четыре группы пропионовой кислоты (рис. 10.2). Декарбоксилирование и последующее окисление этильных групп приводит в итоге к появлению винильных групп в положениях 2 и 4 протопорфириногена. Внедрение иона железа(II) в молекулу протопорфирина IX завершает образование гема.

Все этапы биосинтеза гема контролируются и осуществляются под воздействием определенных ферментов, локализованных в митохондриях и цитоплазме. Нарушения этих процессов, вызванные врожденным или приобретенным дефицитом ферментов, вызывают заболевания, которые называются *порфириями*. Изучение природы этих заболеваний привело к исследованию порфиринов. Кроме того, изучение порфиринов стимулировалось интересом к биохимии и механизму синтеза хлорофилла. Аналитические методы исследования порфиринов включают практически все известные хроматографические и физико-химические методики.

10.1.2. Аналитические методы (исключая ВЭЖХ)

За период, прошедший с 70-х годов прошлого века, ознаменовавшихся опубликованием работ Феликса Хоппе-Зейлера [1], и вплоть до 30-х годов нашего века — до появления работ Ганса Фишера [2], награжденного в 1930 г. Нобелевской премией за исследования порфиринов, аналитические методы изучения этих соединений по существу не претерпели никаких принципиальных изменений. Определялась температура плавления, устанавливался элементный состав и проводились спектрофотометрические

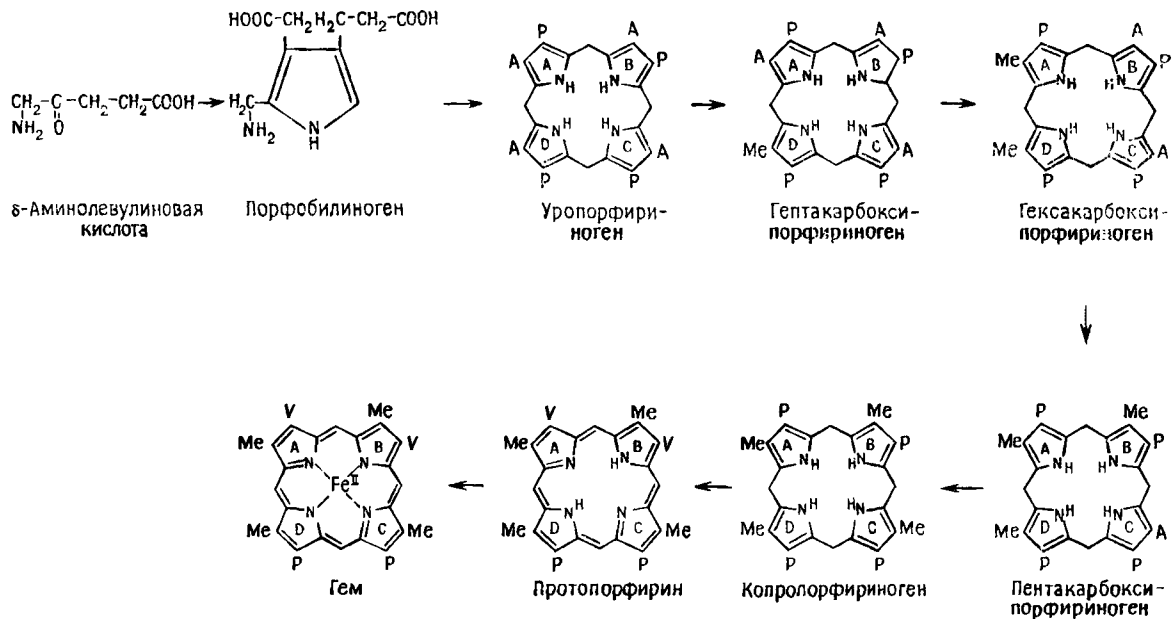


Рис. 10.2. Схема биосинтеза гема.

измерения. Методы фракционирования и количественного определения уро- и копропорфирина мочи были разработаны Римингстоном и др. [3]. Усовершенствованные их варианты [4, 5] находят применение и в настоящее время. В 1945 г. Гринштейн и др. [6] начали адсорбировать порфирины на тальке, что, как выяснилось, оказало существенное влияние на дальнейшее их исследование.

В разработанном Визом [7] методе тонкослойной хроматографии порфиринов используется эта их способность. Метод разделения производных порфиринов, в основном их метиловых эфиров, на пластинках с силикагелем [8, 9] до сих пор один из самых распространенных методов разделения этих соединений, по крайней мере к нему прибегают во многих лабораториях. Колоночная и бумажная хроматография применяется для исследований порфиринов больных порфирией с 1969 г. [10]. Электрофорез [11] и противоточная экстракция [12] используются для выделения порфиринов из биологических объектов. В последние годы исследование порфиринов и металлопорфиринов ведется также такими современными аналитическими методами, как спектрофотометрия (их производных) [13], ядерный магнитный резонанс [14], масс-спектрометрия [15].

10.1.3. Химические и физико-химические свойства

10.1.3.1. Растворимость. Боковые кислотные группы придают порфиринам свойства амфолитов и, следовательно, способность растворяться и в кислотах, и в основаниях. Порфирины хуже всего растворяются в таких водных растворах, рН которых близок к четырем, причем растворимость зависит от значения изоэлектрической точки индивидуальных порфиринов, и легко экстрагируются органическими растворителями. С помощью разбавленных растворов минеральных кислот осуществляют реэкстракцию порфиринов из их растворов в эфире или этилацетате. В самом начале XX в. Вильштеттер и Фишер [16] разработали метод фракционирования порфиринов из растворов в эфире путем их обработки растворами HCl увеличивающейся концентрации. Порфирины, имеющие большее число кислотных групп, менее растворимы в органических растворителях: уропорфин, например, совсем нерастворим в эфире. Металлокомплексы порфиринов нерастворимы в водных растворах кислот, поскольку не могут существовать в форме катионов. Под действием сильных минеральных кислот металлопорфирины теряют центральный ион металла и превращаются в дикатионы. Порфирины с ненасыщенными боковыми группами лучше растворимы в органических растворителях, чем их насыщенные аналоги. Поэтому мезопорфин, имеющий две этильные боковые группы,

Таблица 10.1. Длины волн, соответствующие максимумам возбуждения (полосы Соре) и испускания флуоресценции порфиринами в различных растворителях [41, 43]

Порфирин	Растворитель ^а	Возбуждение, нм	Испускание, нм
Уропорфирин	А	398	618
	Б	405	598
Копропорфирин	А	392	615
	Б	400	589
Протопорфирин IX	А	400	626
	Б	408	604
Zn-Протопорфирин	А	414	586
Октаметилловый эфир уропорфирина	А	398	578

^а А — 50 мМ тетрабутиламмонийфосфат в воде (рН 7.5)/ацетонитрил (34 : 66), Б — 1,5 мМ соляная кислота.

в меньшей степени экстрагируется из водных растворов, чем протопорфирин, имеющий две винильные группы.

10.1.3.2. Спектроскопия. Спектроскопические свойства порфиринов обусловлены тем, что их молекула планарна и что одинарные связи чередуются с двойными. Порфирины имеют специфические спектры поглощения и флуоресценции, что облегчает их обнаружение.

Поглощение в УФ- и видимой областях спектра. В 1883 г. Соре [17] показал, что характеристический спектр поглощения порфиринов имеет четкую интенсивную полосу в области, близкой к ультрафиолетовой (а также несколько полос в видимой области). Длины волн, соответствующие полосам Соре, и их молярные коэффициенты поглощения зависят от природы боковых групп порфиринов и от применяемого растворителя (табл. 10.1). Наиболее высокие ($5 \cdot 10^5$ л/(моль·см)) молярные коэффициенты поглощения наблюдаются у ряда порфириновых дикатионов.

Флуоресценция. Облучение порфиринов в ближней УФ-области вызывает интенсивную флуоресценцию в красной области, причем более интенсивную в кислой среде, чем в нейтральной или щелочной. Изменение боковых цепей и растворителя приводит к изменению положения полосы и интенсивности испускания (табл. 10.1). Большинство металлопорфиринов, содержащихся в биологических материалах, не способны к флуоресценции. Исключение составляют Zn-комплексы. Батохромный сдвиг, наблюдаемый для этих порфиринов, примерно равен наблюдаемому для свободных порфиринов (табл. 10.1). Поскольку флуо-

ресцентный метод характеризуется более высокой селективностью и чувствительностью по сравнению со спектрофотометрическим, он широко используется для определения концентрации порфиринов.

10.2. Методы подготовки проб

При выборе методики анализа порфиринов необходимо учитывать, с какой целью он проводится. Рутинный метод должен быть максимально простым и быстрым и должен давать воспроизводимые и достоверные данные. Поскольку ВЭЖХ — высокочувствительный и достоверный метод, большое значение приобретают способы подготовки проб к хроматографическому анализу. Методы предварительной обработки включают, как правило, такие стадии, где точность проводимых измерений значительно ниже, чем у собственно хроматографического метода, что снижает точность конечных результатов. Степень сложности методов подготовки биологических проб для хроматографического разделения обусловлена их природой. Выбор метода хроматографического разделения определяет характер подготовки образца к анализу. Порфирины можно разделять и анализировать в виде эфиров, как правило метиловых, либо непосредственно в виде природных свободных порфиринкарбоновых кислот.

Чтобы избежать разложения порфиринов, все операции с порфиринсодержащими образцами необходимо проводить в темноте или при освещении красным светом.

Наиболее распространенные методы подготовки проб обсуждаются в начале соответствующих разделов.

10.2.1. Моча

10.2.1.1. Эфиры порфиринов. Процедура подготовки проб включает три стадии: выделение, этерификацию и концентрирование.

Эфиры порфиринов, в основном метиловые, отличаются большей растворимостью в органических растворителях, чем свободные порфирины, что облегчает их экстракцию из биологических материалов. Схема, приведенная на рис. 10.3, отражает наиболее широко распространенный метод подготовки к анализу проб мочи и кала [18—20].

Адсорбция на тальке. К аликвотному объему пробы мочи, рН которой предварительно доводят до 4, добавляют навеску талька (рис. 10.3). Смесь перемешивают и фильтруют. Фильтрат, из которого порфирины должны быть удалены адсорбцией на тальке, проверяют на остаточную флуоресценцию в красной области. И если таковая обнаружена, а это означает, что в мо-

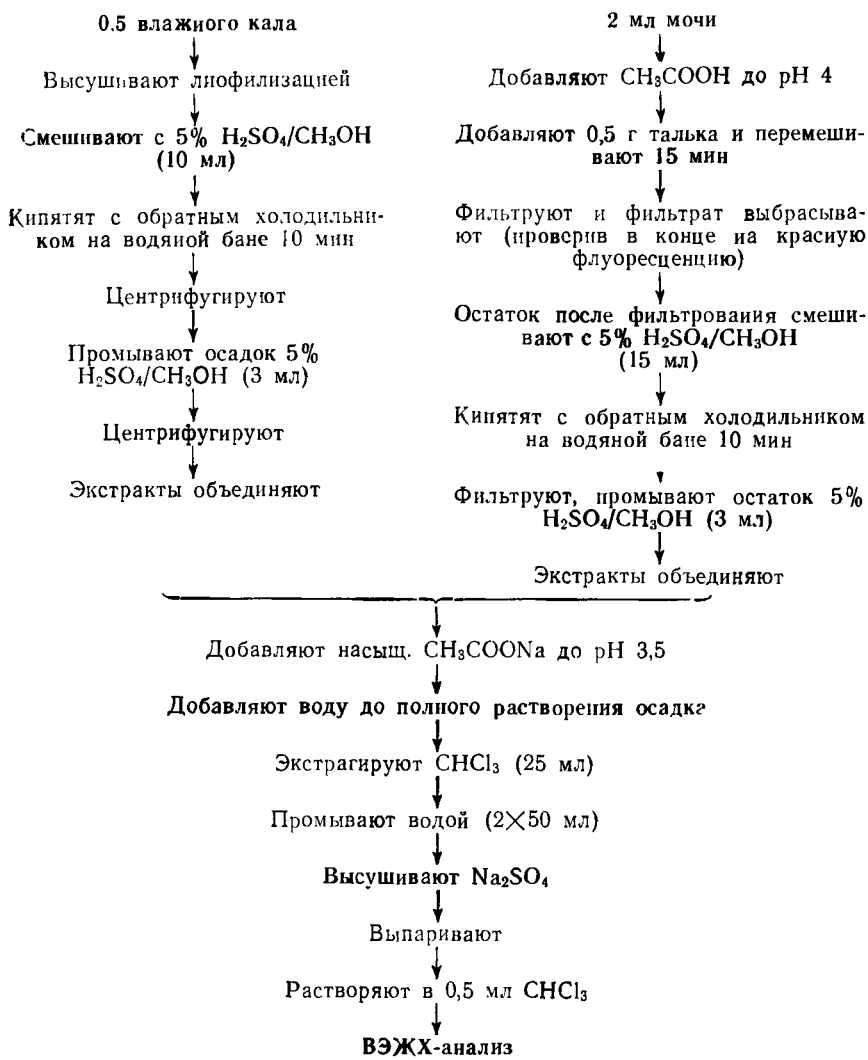


Рис. 10.3. Схема выделения и этерификации порфиринов мочи и кала.

че остались значительные количества порфиринов, проводят дополнительную обработку тальком (см. схему на рис. 10.3).

Экстракция растворителями. Другой метод выделения порфиринов — экстракция их органическими растворителями из мочи, pH которой доведен до 3,0 концентрированной соляной кислотой [8, 21]. На первой стадии экстракцию проводят смесью этил-ацетат/*n*-бутанол (1:1). Далее несколько раз экстрагируют

пробу *n*-бутанолом, пока в органической фазе не перестанет обнаруживаться флуоресценция в красной области. После этого органическую фазу промывают водой и упаривают досуха, остатки этерифицируют.

Предварительное разделение на полистироле. Авторы работы [22] проводят предварительное разделение пробы на колонке с полистиролом (ХАД-2). После нанесения пробы колонку промывают 0,1 М HCl и затем элюируют порфирины 2%-ной HCl в ацетоне. После выпаривания растворителя сухой остаток этерифицируют (см. следующий раздел). Выход порфиринов мочи составляет 80—100%.

Этерификация. Этерификация порфиринов мочи, адсорбированных на тальке, проводится одним из следующих методов: 10-минутное кипячение в 5%-ном растворе серной кислоты в метаноле [19] или 16-часовое выдерживание при 20 °C в 10%-ном метанольном растворе серной кислоты. Для проб мочи с высоким содержанием порфиринов допустима непосредственная этерификация смесью серная кислота/метанол [18, 21], однако наличие следов воды может препятствовать полной этерификации [24]. Этерификацию проводят также такими реагентами, как 5%-ный трифторид бора в метаноле [25, 26] или диазометан [18] (последний используют реже).

Выходы. Обработка проб мочи описанными выше методами обеспечивает выход порфиринов на уровне 75—80% [18]. В некоторых публикациях сообщается о получении 100%-ного выхода порфиринов с насыщенными боковыми цепями [27, 28]. Выход протопорфирина, содержащего винильные группы, ниже, что обусловлено, по-видимому, его разложением (незначительным) в процессе обработки пробы.

Количественный анализ эфиров порфиринов затрудняют неполная их этерификация [18, 29] и образование смешанных метил-этиловых эфиров после обработки в среде хлороформа, стабилизированного этанолом [30].

10.2.1.2. Свободные порфирины. Для анализа свободных порфиринов мочи при помощи ВЭЖХ предварительная обработка пробы практически не нужна, что позволяет сэкономить время, затрачиваемое на этерификацию.

Пробы, предназначенные для разделения при помощи ИПХ. Аликвотную часть пробы мочи, предназначенной для разделения методом ИПХ, можно вводить непосредственно в хроматографическую колонку [31]. Однако авторы работ [32, 33] предварительно фильтруют пробу, чтобы удалить из нее взвешенные частицы, которые могут забить колонку.

Концентрация порфиринов в моче может быть чрезвычайно большой (>20 мг/л). Такие пробы следует разбавлять; разбавляют пробу обычно элюентом [31, 33].

Пробы, предназначенные для разделения при помощи других методов. Методы разделения, включающие «улавливание» порфиринов на предколонке [34] или элюирование кислотными элюентами [35], требуют предварительного подкисления пробы и ее центрифугирования.

Авторы работы [36] высушивали наибольшие количества мочи (50—100 мкл) при 90 °С в слабом токе воздуха, а полученный остаток растворяли в элюенте. Однако такая обработка может вызывать разложение некоторых порфиринов.

10.2.2. Кал

Независимо от выбранного метода обработки пробу кала целесообразно высушить, чтобы с ним легче было работать и чтобы ослабить его запах. Полная дезодорация проб кала достигается лиофилизацией, после проведения которой пробу диспергируют. Экстракция кала (50 мл/г) большим объемом охлажденного льдом ацетона также позволяет получить сухой хрупкий остаток [26], однако этот метод более трудоемок и сложен, чем первый.

10.2.2.1. Эфиры порфиринов. *Непосредственная этерификация.* В большинстве опубликованных работ порфирины кала этерифицируют без предварительной экстракции [18, 20, 24]. Содержание порфиринов в кале может быть большим, поэтому пробы обрабатывают этерифицирующим реагентом несколько раз, одновременно осуществляется и экстракция. Обработку эфиров порфиринов проводят до отрицательной реакции фильтрата по красной флуоресценции [18] (рис. 10.3). Этерифицирующие реагенты и методика этерификации приведены на схеме, показанной на рис. 10.3 (они практически аналогичны методам обработки мочи).

Очистка порфириновой фракции. Дополнительная очистка, предусматривающая разделение пробы на колонке с силикагелем, предложена двумя различными группами исследователей [25, 37]. Авторы работы [25] ввели ее с тем, чтобы удалить из пробы диетических продуктов пигменты. Однако поскольку пигменты не мешают разделению порфиринов методом ВЭЖХ и их последующему обнаружению при помощи современных методов, то проводить предварительное отделение пигментов нецелесообразно. Авторы второй работы [37] проводили предварительное разделение исходной смеси порфиринов на две фракции, содержащие соответственно от прото- до уропропорфиринов и «субуропропорфирины». Вторая из фракций элюировалась после уропорфирина и состояла в основном из неполностью этерифицированных уропорфиринов [38].

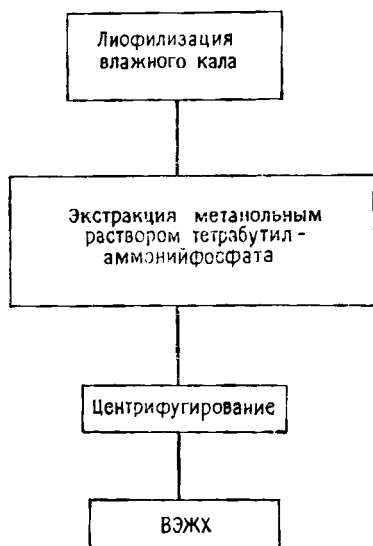


Рис. 10.4. Схема подготовки пробы кала.

10.2.2.2. Свободные порфирины. Кал представляет собой сложную смесь, из которой трудно количественно экстрагировать свободные порфиринкарбоновые кислоты. В работах [20, 39] описано несколько способов экстракции с последующим спектроскопическим исследованием полученных фракций порфиринов. Однако рекомендуемые в этих работах смеси растворителей не позволяют провести полную экстракцию уропорфиринов. Наилучшие результаты, как показали эксперименты, проведенные на стандартных смесях порфиринов, добавленных к пробам кала, дает экстракция смесями метанол/вода, к которым добавлен фосфат тетрабутиламмония [40].

50 мг сухого диспергированного кала экстрагируют по меньшей мере тремя порциями (1 мл каждая) 60 мМ раствора фосфата тетрабутиламмония в смеси метанол/вода (80:20); последний экстракт не должен давать красной флуоресценции. Объединенные экстракты центрифугируют и аликвотную часть надосадочной жидкости вводят непосредственно в хроматографическую колодку (рис. 10.4).

10.2.3. Кровь, ткани и другие объекты

Определение порфиринов в цельной крови и в эритроцитах широко применяют для выявления отравлений свинцом [41] и исследований биосинтеза порфирина [42]. Определение порфирина в плазме или сыворотке крови необходимо лишь в считанных случаях [43]. Под действием растворителей, используемых для

экстракции и этерификации, эритроциты обычно подвергаются лизису. Животные ткани, а также бактерии перед выделением порфиринов следует гомогенизовать, поскольку их клетки более устойчивы.

Из животных тканей порфирины в большинстве случаев выделяют в виде эфиров, поскольку это облегчает экстракцию.

10.2.3.1. Эфиры порфиринов. Экстракция растворителями. Перед этерификацией проб клеток и тканей обычно проводят их экстракцию [42, 44]. Гомогенат клеток дважды экстрагируют смесью этилацетат/уксусная кислота (7:3). Объединенную надосадочную жидкость промывают 3%-ным водным раствором ацетата натрия и далее водой. Из органической фазы порфирины вначале экстрагируют водным раствором соляной кислоты и после этого реэкстрагируют эфиром. Эфирную фракцию промывают водой, эфир выпаривают, сухой остаток обрабатывают этерифицирующими реагентами [42, 44].

Адсорбция на тальке. Белки из гемолизата эритроцитов осаждают раствором хлорной кислоты в этаноле и удаляют. Доводят рН надосадочной жидкости до 3,5 и добавляют в раствор тальк, на котором адсорбируются порфирины [30]. Дальнейшая процедура осуществляется так же, как и при обработке проб кала (см. схему на рис. 10.3).

Этерификация. Порфирины. Другой метод, описанный авторами работ [25, 48], заключается в прямой этерификации гомогенизата указанными выше реагентами. Последующая процедура очистки аналогична используемой при обработке проб кала (см. схему на рис. 10.3).

Хелаты порфиринов. В работе [46] опубликован метод этерификации цинк- и магний-хелатов протопорфирина, предназначенный для исследований процесса комплексообразования порфиринов, протекающего в клетках [46]. Хелаты порфиринов были очищены с помощью ТСХ и далее переведены в метиловые эфиры диазометаном.

10.2.3.2. Свободные порфирины. Порфирины эритроцитов содержат в основном цинк-протопорфирины [47], исследовать которые можно лишь очень немногими методами [41, 48, 49], поскольку металлопорфирины разлагаются сильными кислотами.

Разделение гемолизата. Авторы работы [41] использовали для определения содержания порфиринов пробы цельной крови, обработанной смесью тритона X-100 и 50 мМ раствора тетрабутиламмонийгидроксида в воде (рН 7,5). После центрифугирования аликвотную часть надосадочной жидкости вводили непосредственно в хроматографическую колонку.

Экстракция растворителями. Кровь. Экстракция смесью этилацетат/уксусная кислота (3:1) была использована для предва-

рительной обработки пробы двумя группами исследователей [48, 49]. В хроматографическую колонку они вводили аликвотную часть полученной органической фазы. Хотя вводимые в колонку пробы содержали некоторое количество гемина и родственных ему соединений, мешающих обнаружению порфиринов, их влияние можно свести до минимума, если подобрать такие условия разделения, которые обеспечат его селективность.

Чтобы удалить соединения, мешающие обнаружению порфиринов, их повторно экстрагируют из органической фазы соляной кислотой [50, 51]. Выделить цинк-протопорфирин не удастся ни из солянокислого раствора [50], ни из раствора порфирина в элюенте после дополнительной их экстракции эфиром [51].

Плазма. Аналогичный метод экстракции был использован для выделения свободных порфиринкарбоновых кислот [43].

Ткани. Авторы работы [31] провели анализ состава свободных порфиринов, содержащихся в тканях глубоководной медузы. Гомогенизованную пробу экстрагировали элюентом, состоящим из смеси водного 1 мМ тетрабутиламмонийдигидрофосфата и этанола (17 : 3). Полученный экстракт фильтровали и аликвотную часть фильтрата без какой-либо дополнительной очистки вводили непосредственно в колонку.

10.3. Методики разделения

Разделение порфиринов имеет чрезвычайно важное практическое значение в первую очередь потому, что позволяет диагностировать порфириновые болезни. Поэтому в большинстве опубликованных работ, посвященных разделению порфиринов методом ВЭЖХ, описано клиническое применение метода. Состав порфиринов в различных видах биологических материалов различен. Для выявления порфириновых заболеваний наиболее целесообразно определять содержание порфиринов — от уропорфирина до копропорфирина и изокопропорфирина в моче пациентов. При анализе кала кроме перечисленных соединений следует также определять дикарбоксипорфирины, главным образом протопорфирин и его метаболиты (мезо- и дейтеропорфирин) — они образуются в качестве продуктов метаболизма под действием бактерий в прямой кишке. Цинк-протопорфирин был обнаружен среди порфиринов эритроцитов. Поэтому методики ВЭЖХ, применяемые в клинических лабораториях, должны позволять проводить разделение и идентификацию всех перечисленных порфиринов.

Разделение порфиринов при помощи ВЭЖХ осуществляется также с целью исследования биосинтеза порфиринов — как синтетических, так и выделенных из биологических материалов.

Разделение порфиринов можно проводить, используя свободные порфиринкарбоновые кислоты или их эфиры. Даже в на-

стоящее время во многих лабораториях для разделения эфиров порфиринов методом ВЭЖХ используются колонки, заполненные полярным силикагелем. Однако для разделения свободных порфиринов вполне пригодны обращенные фазы, получившие в настоящее время столь широкое распространение.

10.3.1. Разделение эфиров порфиринов

В начале 70-х годов в качестве неподвижной фазы в ВЭЖХ применялся силикагель и разделение осуществлялось по механизму адсорбционной хроматографии. Таким образом, методики, разработанные для разделения эфиров порфиринов методом ТСХ, легко было приспособить для ВЭЖХ. Некоторые из методов разделения, разработанных в то время, представляют сейчас лишь исторический интерес, поскольку используемые в них оборудование и материалы устарели. В 1975 г. несколько научных групп опубликовали разработанные независимо друг от друга методы ВЭЖХ, позволяющие проводить качественный и количественный анализы эфиров порфиринов в тканях и биологических жидкостях человека [15, 28, 37, 52—54].

10.3.1.1. Программирование объемной скорости. Для исследования порфиринов из различных природных источников Эванс и др. [15, 53] использовали ВЭЖХ в сочетании с масс-спектрометрией. Эфиры порфиринов разделяли на ВЭЖХ-колонках, заполненных поверхностно-пористым (корасил II) или тонкодисперсным (лихросорб SI60, 10 мкм) силикатом. В качестве элюента для колонок с корасилом была выбрана смесь бензин/этилацетат (55:45). После завершения элюирования порфиринпентакарбоновой кислоты объемную скорость увеличивали (стартовое значение 1 мл/мин), чтобы ускорить элюирование более полярных соединений и уменьшить ширину пиков. Однако чувствительность обнаружения при этом снижалась, более того, время удерживания метилового эфира уропорфина составляло 26 мин, а пик был относительно широким.

Авторы работы [25] предложили разделять стандартные смеси порфиринов на колонке (30×0,4 см) с μ -порасилом при элюировании смесью бензол/этилацетат/хлороформ (7:1:2) с программируемым увеличением объемной скорости от 2 до 3 мл/мин после выхода эфира порфиринпентакарбоновой кислоты. Несмотря на то что элюирование более полярных соединений велось при большей объемной скорости, у пика метилового эфира уропорфина наблюдался заметный хвост.

10.3.1.2. Градиентное элюирование. Авторы работы [37, 52] изучали состав смеси метиловых эфиров порфиринов, выделенных из мочи и кала. С этой целью они использовали колонки

(60×0,3 см), заполненные различными неподвижными фазами, в частности корасилом II и порасилом Т. На пооследней были успешно разделены смеси порфиринов, содержащих от 2 до 8 эфирных групп. Элюирование велось в градиентном режиме: от смеси бензин/метилендихлорид (40:100) плюс 0,1% триэтиламина до смеси бензин/метилендихлорид/*n*-пропанол (15:100:50). Градиент создавался в результате того, что менее полярный растворитель помещался в петлю между насосом и колонкой. При объемной скорости 1 мл/мин более полярная смесь достигала колонки через 12 мин.

Пытаясь улучшить разделение, достигнутое при программировании объемной скорости, Эванс и др. [15, 21] обратились к методике градиентного элюирования и провели хроматографирование на колонке (60×0,3 см) с лихросорбом SI 60. Время удерживания изменялось от 4 мин для эфира протопорфирина до примерно 20 мин для эфира уропорфирина.

На полученной хроматограмме наблюдалось несколько широких пиков с максимумом поглощения. Элюирование велось в экспоненциальном градиентном режиме при объемной скорости 3 мл/мин от гексана до 70%-ного этилацетата в гексане. Отдельные компоненты элюента смешивались в стеклянной смесительной камере, устройство которой подробно описано в работе [21]. В результате применения градиентного элюирования время удерживания значительно уменьшилось, например метиловый эфир уропорфирина выходил из колонки через 12 мин. Обнаружение копропорфирина проводилось при 400 нм, предел обнаружения составлял 1—2 пмоль. Для метода характерна высокая воспроизводимость времени удерживания, что облегчает идентификацию пиков по стандартам. Для количественного анализа использовался внутренний стандарт — в данном случае мезопорфирин IX, который следует добавлять в образец перед этерификацией и экстракцией. Для проведения разделения необходимо 10—20 пмоль компонентов, причем количества материала, собранного при элюировании одного пика, достаточно для последующего его масс-спектрометрического анализа, который позволяет идентифицировать структуру метиловых эфиров порфиринов (после их разделения).

При разделении на колонке (25×0,2 см), заполненной лихросорбом SI 100, в условиях градиентного элюирования время удерживания порфиринов относительно мало (<6 мин) [55]. Градиент формируется в результате увеличения концентрации тетрагидрофурана в гептане от 20 до 50% в течение 7 мин (2 мл/мин). Обнаружение осуществлялось при 400 нм (полоса Соре). Образец эфиров порфиринов необходимо растворять в хлороформе, поскольку в элюенте они плохо растворимы. Чтобы разрешение было приемлемым, объем вводимой пробы не должен превышать 50 мкл.

10.3.1.3. Изократическое элюирование. *Метилловые эфиры порфиринов.* Хроматограммы метиловых эфиров порфиринов мочи представлены в работе Эванса и др. [18], которая была опубликована позднее, чем описанный выше метод. Разделение эфиров порфиринов, содержащих от 2 до 8 карбоксильных групп, было осуществлено на колонке ($20 \times 0,4$ см), заполненной партилсом (5 мкм), менее чем за 10 мин. Элюирование проводили смесью этилацетат/циклогексан (60:40) в изократическом режиме с объемной скоростью 1,5 мл/мин. Следует отметить, что разделение эфиров порфиринкарбоновых кислот — от ди- до пентаэфиров, содержащихся в моче, было недостаточно хорошим для количественной идентификации всех порфиринов. Очистка проб проводилась тремя различными методами; результаты хроматографического анализа во всех трех случаях совпадали.

В 1977 г. Грей и др. [19] опубликовали метод разделения при помощи ВЭЖХ порфиринов, входящих в состав мочи или кала больных, страдающих практически всеми видами порфирии. Разделение проводили на колонке ($30 \times 0,4$ см) с портилсом при изократическом элюировании смесью *n*-гептан/метилацетат (3:2) при объемной скорости 1,5 мл/мин. Для обнаружения использовали УФ-детектор (404 нм). Метилловые эфиры порфиринов элюировались с хорошим разрешением в порядке увеличения полярности их молекул. Время удерживания эфиров мезо- и уропорфиринов составляло от 4 до 16 мин соответственно.

Приведем в качестве примера две хроматограммы, показывающие, какие порфирины содержатся в кале и моче больных врожденной копропорфирией (рис. 10.5) и в моче больных конгигетальной эритропоэтической порфирией (рис. 10.6).

В двух более ранних публикациях те же авторы изложили результаты исследования влияния на разделение эфиров порфиринов хроматографических условий, включая программирование объемной скорости и состава элюента [26, 54]. Однако наилучшее разделение смесей метиловых эфиров порфиринов, причем за приемлемое время, было достигнуто при изократическом элюировании.

Авторы работы [20] провели сравнительное изучение фракционирования порфиринов методом экстракции смесью соляной кислоты и эфира и методом ВЭЖХ. Хроматографическое разделение проводили по методу, описанному в работе [19]. В пробу кала до этерификации вводили в качестве внутреннего стандарта дейтеропорфирин. Чтобы исключить влияние эндогенного дейтеропорфирина, пробу кала анализировали как в присутствии, так и в отсутствие внутреннего стандарта.

Как выяснилось, метод фракционирования дает ошибочные (завышенные) результаты из-за наличия протопорфирина в копропорфириновой фракции.

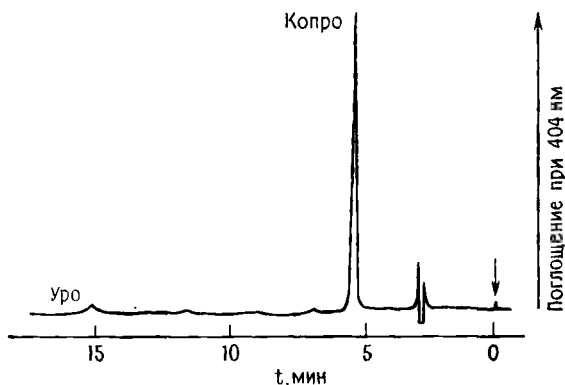


Рис. 10.5. Хроматограмма метиловых эфиров порфиринов, содержащихся в моче больных врожденной копропорфирией [19].

Напротив, при использовании метода ВЭЖХ разделение было полным, так что возможная причина ошибки была исключена.

Си-хелаты порфириновых эфиров. Анализируя состав стандартной смеси метиловых эфиров порфиринов, выдержанных в течение трех суток в разбавленном растворе хлороформа, Эванс и др. [18] обнаружили в ней неизвестные соединения. Разделение этой смеси проводилось в тех же условиях, что и разделение эфиров порфиринов (неподвижная фаза — партисил, элюент смесь этилацетат/циклогексан). Масс-спектрометрический анализ показал, что неизвестные соединения представляют собой Си-хелаты порфириновых эфиров. Вероятно, следы кислоты, содержащиеся в хлороформе, вызывали растворение микроколичеств меди из стенок сосуда, в котором находилась смесь

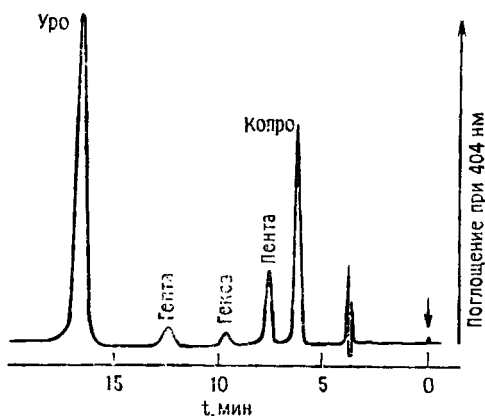


Рис. 10.6. Хроматограмма метиловых эфиров порфиринов, содержащихся в эритроцитах больных врожденной эритропоэтической порфирией [19].

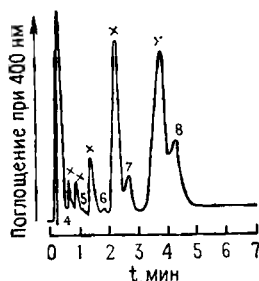


Рис. 10.7. Хроматограмма метиловых эфиров порфиринов и их хелатов с медью, содержащихся в экстракте кожи, после его 2-часового инкубирования с ацетатом меди [45].

8 — уропорфирин; 7 — порфирингептакарбоновая кислота; 6 — порфирингексакарбоновая кислота; 5 — порфиринпентакарбоновая кислота; 4 — копропорфирин (звездочками помечены пики хелатов меди).

эфиров порфиринов (или из хроматографической системы). Ионы меди(II) образуют хелаты с порфиринами, имеющими небольшое число карбоксильных групп. Комплексообразование наблюдалось уже через несколько часов. Анализ порфиринов, содержащихся в пробах кожи больных порфирией cutanea tarda, осуществлен при помощи ВЭЖХ метиловых эфиров Cu-хелатов порфиринов [45]. В соответствующие комплексы порфирины переводили после их этерификации, обрабатывая 0,1%-ным раствором ацетата меди(II) в смеси хлороформ/метанол. Высушенный остаток растворяли в хлороформе и аликвотную часть полученного раствора разделяли на колонке (25×0,2 см), заполненной неподвижной фазой микропак CN с привитыми алкилнитрильными группами, при элюировании в изократическом режиме смесью *n*-гептан/этилацетат/изопропанол (60:40:0,5). Обнаружение проводили УФ-детектором (400 нм). Полученная хроматограмма показана на рис. 10.7. Элюирование разделяемых соединений происходит очень быстро, но порфирины с несколькими карбоксильными группами разделяются недостаточно хорошо. В своей последующей работе [56] эта же группа исследователей показала, что можно повысить чувствительность обнаружения и несколько улучшить качество разделения.

Хелаты эфиров протопорфиринов. Хелаты метиловых эфиров протопорфиринов IX с атомами цинка и магния были разделены с помощью ВЭЖХ в процессе исследования комплексообразования протопорфиринов в препаратах этиопластов [46]. Этерифицированные хелаты были очищены при помощи ТСХ и разделены на колонке (25×0,4 см) с браунли лихросорбом при элюировании смесью ацетон/гексан (15:85) с объемной скоростью 2 мл/мин.

Смешанные метилэтиловые эфиры порфиринов. Авторы работы [29] опубликовали методику получения и выделения смешанного метилэтилового эфира уропорфирина на колонке с м-порасилом при элюировании смесью этилацетат/*n*-гептан (55:45). В процессе изучения с использованием метода ВЭЖХ фермента уропорфориноген-декарбоксилазы, выделенной из гемолизата эритроцитов, на полученной хроматограмме порфири-

нов некоторые пики идентифицировать не удалось. При сравнении одного из этих соединений с синтезированными метилэтиловыми эфирами порфиринов выяснилось, что оно представляет собой гептаметилмоноэтиловый эфир уропорфирина.

10.3.1.4. Препаративное разделение. Авторы работ [15, 57] использовали препаративную ВЭЖХ для выделения и очистки эфиров порфиринов из кала крыс, отравленных гексахлорбензолом. Разделение осуществляли на колонке ($121 \times 2,5$ см), заполненной порасилом А (37—75 мкм), при экспоненциальном градиентном элюировании от гексана до этилацетата (3 ч) [15]. Хотя разделение длилось довольно долго, разрешение было хорошим.

10.3.1.5. Разделение изомеров. Основная хроматографическая проблема, связанная с исследованием биосинтеза порфиринов, — это разделение изомеров.

Эфиры гардеропорфиринов. Одна из первых работ, посвященная этой проблеме, была опубликована в 1974 г. [44]. Разделение двух изомеров тетраметилового эфира гардеропорфирина — предшественника протопорфирина IX, содержащего всего одну винильную группу, было осуществлено на колонке с корасилом II при элюировании смесью хлороформ/циклогексан.

Спустя несколько лет смесь этих соединений и метилового эфира протопорфирина IX была разделена в несколько измененных условиях [58]. Элюент представлял собой смесь циклогексана и этилацетата (4:1), обнаружение проводили при помощи УФ-детектора в области полосы Core (402 нм).

Эфиры порфирингексакарбоновых кислот. Изучая механизм декарбоксилирования уропорфириногена, приводящего к образованию копропорфириногена, авторы работы [59] использовали ВЭЖХ для разделения изомерных гексаметиловых эфиров порфирингексакарбоновых кислот. Эти порфирины образуются в гемолизате эритроцитов цыпленка при инкубировании его с соответствующими порфирингептакарбоновыми кислотами. Разделение проводилось на ВЭЖХ-колонке ($150 \times 0,5$ см) с партисилом (5 мкм) при элюировании 1%-ным раствором ацетона в хлороформе с объемной скоростью 1 мл/мин.

Эфиры копропорфиринов. Поскольку использовавшиеся ранее методы анализа порфиринов, включая ВЭЖХ, не позволяют осуществить разделение изомеров уропорфирина, эти соединения необходимо декарбоксилировать в запаянных трубках до соответствующих копропорфиринов. Изомеры полученных копропорфиринов хроматографируют в виде этиловых эфиров на колонке ($30 \times 0,4$ см) с μ -бондапаком при элюировании смесью ацетонитрил/вода (7:3) [60]. Для выделения трех фракций, содержащих изомеры I, III/IV и II, необходимо провести два хроматографических цикла. Смесь изомеров III и IV этерифи-

цировали и полученные метиловые эфиры хроматографировали на двух колонках с порасилом при элюировании смесью эфир-/гептан (2:3) с объемной скоростью 2 мл/мин. Для полного разделения компонентов понадобилось осуществить 10—12 циклов. Обнаружение проводили при длине волны 380 нм.

В том же году другая группа ученых также провела успешное разделение метиловых эфиров различных копропорфиринов [18, 26].

Проводя элюирование смесью этилацетат/циклогексан (4:6) при объемной скорости 1,5 мл/мин, авторы работы [18] разделили на колонке с партисилом метиловые эфиры копро- и изокопропорфиринов. Пики на хроматограмме достигали нулевой линии. Хроматографирование метилового эфира копропорфирина и метиловых эфиров диэтил- и изокопропорфиринов осуществлялось на колонке с μ -партисилом при элюировании смесью метилацетат/изооктан (1:4).

Эфиры уропорфиринов. Большинство природных уропорфиринов относится к типу изомера III. В нормальных условиях уропорфирин I присутствует в биологических объектах только в микроколичествах. Однако при некоторых определенных заболеваниях возможны образование и секреция значительного количества уропорфирина I. В последние годы опубликовано несколько методов разделения изомеров эфиров уропорфиринов [61—63].

Авторы работы [61] первыми применили ВЭЖХ для разделения изомеров I и III. Они провели хроматографирование на двух колонках с μ -порасилом, элюируя пробу смесью *n*-гептан/уксусная кислота/ацетон/вода (90:60:30:0,05) с объемной скоростью 1,5 мл/мин. Удовлетворительное разделение достигалось после пяти циклов (рис. 10.8). Используя меченные ^3H (I) и ^{14}C (III) изомеры, эти авторы показали, что потери в процессе хроматографирования составляют менее 2%.

В работе [62] описан модифицированный вариант рассмотренного выше метода, согласно которому элюирование ведется смесью *n*-гептан/уксусная кислота/ацетон (6:3:2). При объемной скорости 0,5 мл/мин почти полное разделение изомеров I и III достигалась за один хроматографический цикл, однако длился он почти 3 ч. Кроме того, необходимо было в течение нескольких часов уравнивать колонки элюентом, содержащим дополнительно одну часть воды. При использовании этой же системы для разделения всех четырех октаметиловых эфиров уропорфирина были выделены три фракции, содержащие изомеры I, III/IV и II. Все попытки разделить изомеры III и IV потерпели неудачу.

Относительно недавно опубликован метод разделения метиловых эфиров уропорфиринов I и III, позволивший значительно (до 20 мин) сократить длительность анализа [63]. Разделение

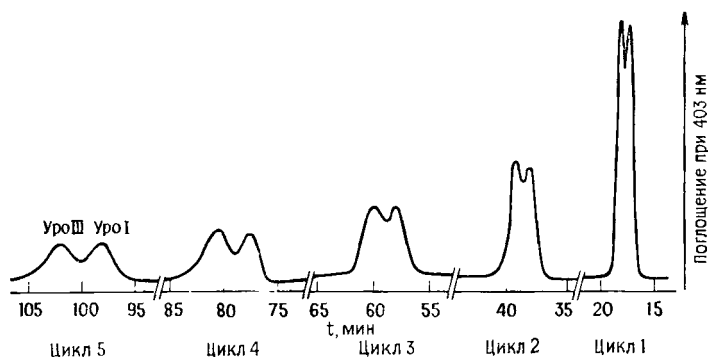


Рис. 10.8. Разделение октаметилэфиров уропорфиринов I и III с использованием нескольких хроматографических циклов.

проводится на колонке ($25 \times 0,5$ см) с гиперсилом APS. Несмотря на многочисленные попытки улучшить разделение путем модифицирования элюента — смеси гексан/этилацетат/бутанол/уксусная кислота (85:12:3:0,1), полного разрешения пиков (до нулевой линии) достигнуть не удалось. Тем не менее в диагностических целях метод можно считать вполне приемлемым.

10.3.2. Разделение свободных порфиринов

Все изложенные выше методы предполагают разделение порфиринов в виде их эфиров, хотя природные порфирины имеют свободные карбоксильные группы. Промежуточная стадия этерификации хотя и достаточно проста, однако в ряде случаев может порождать проблемы, такие, например, как неполная и дифференцированная этерификация или взаимодействие этерифицирующего агента с винильными группами порфиринов. Более того, процедуры этерификации и экстракции эфиров являются трудоемкими. Очевидно, что разделение немодифицированных порфиринов (имеющих свободные карбоксильные группы), содержащихся в биологических пробах, более предпочтительно.

Разделение в этом случае целесообразно проводить на обращенной фазе, наиболее пригодной для хроматографирования полярных веществ и получившей в настоящее время широкое распространение. Методы разделения свободных порфиринов необходимо адаптировать с учетом специфики свойств конкретных биологических материалов, в составе которых они находятся, так как эти свойства оказывают значительное влияние на результаты разделения.

10.3.2.1. Ион-парная обращенно-фазовая хроматография. Разделение методом ИПХ проводят при добавлении в элюент

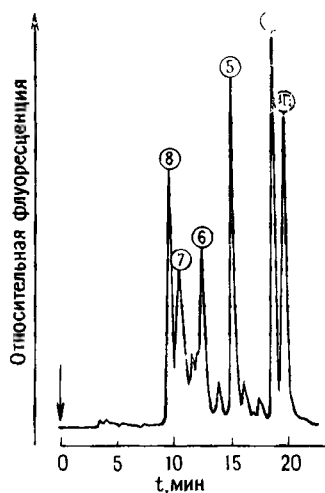


Рис. 10.9. Разделение порфириновых стандартов, растворенных в моче, при помощи ион-парной хроматографии на обращенной фазе.

Нумерация пиков соответствует числу карбоксильных групп в составе порфиринов 4I и 4III — копропорфирины I и III.

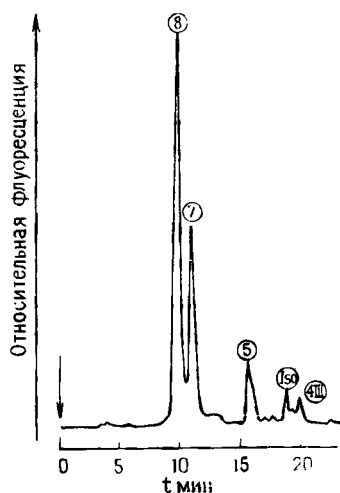


Рис. 10.10. Разделение при помощи ион-парной хроматографии на обращенной фазе свободных порфиринов мочи больных *porphyria cutanea tarda*.

Нумерация пиков соответствует числу карбоксильных групп в составе порфиринов. Изо — изокопропорфин, 4III — копропорфин III.

ион-парного реагента, представляющего собой ионогенное соединение, растворимое до некоторой степени в неполярных органических растворителях. Ион-парные реагенты улучшают экстракцию ионогенных соединений и их разделение на обращенных фазах. Для образования «ионных пар» с кислотными группами свободных порфиринов в качестве противоиона несколькими группами авторов был выбран тетрабутиламмонийфосфат [31—33, 40, 41].

Моча. Авторы работы [31] первыми описали разделение свободных порфиринов при помощи ион-парной ВЭЖХ на колонке размером $30 \times 0,4$ см, заполненной обращенной фазой μ -бондапак C_{18} . В качестве ион-парного реагента они выбрали 1 мМ раствор дигидрофосфата тетрабутиламмония. Элюирование проводили смесью спирт/вода различного состава при объемной скорости от 1 до 1,5 мл/мин в зависимости от целей разделения. Аликвотную часть пробы мочи вводили непосредственно в колонку, элюирование осуществляли смесью метанол/вода (20:80), обнаружение — по поглощению при 400 нм. Следует отметить, что попытки других исследователей воспроизвести результаты работы [31], в которой анализ длился в течение 11 мин, не увенчались успехом.

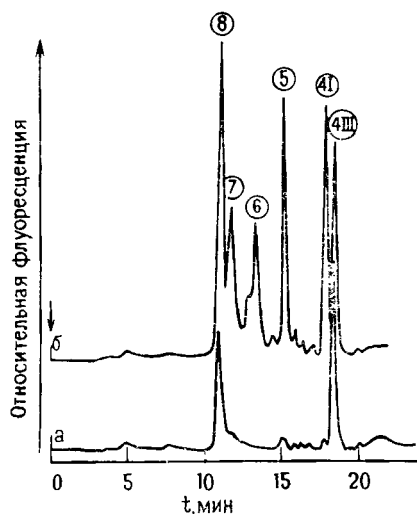


Рис. 10.11. Анализ состава порфирик-карбоновых кислот в моче больных острой интермиттирующей порфирией. а — 50 мкл мочи пациента; б — 50 мкл стандартной смеси порфиринов. Нумерация пиков та же, что на рис. 10.9.

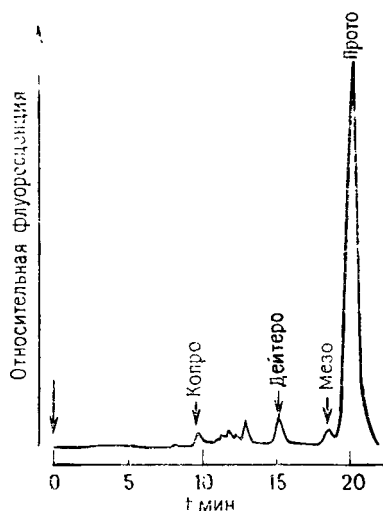


Рис. 10.12. Разделение на μ -бондапаке свободных порфиринов экстракта кала больного эритрогепатической протопорфирией.

В отличие от авторов указанной работы авторы данной главы [32, 33, 40] пришли к выводу, что разделение свободных порфирик-карбоновых кислот необходимо проводить при градиентном элюировании. Индивидуальные порфирины от уро- до мезопорфиринов были разделены с хорошим разрешением на μ -бондапаке C_{18} в условиях мультилинейного градиента от 30 до 100% метанола в воде при концентрации фосфата тетрабутиламмония в том и в другом 5мМ (pH 7,5) [32, 33] (рис. 10.9). Длительность анализа с учетом 15-минутного уравнивания колонки стартовым элюентом составляла 45 мин. Объединенные вместе насосы обеспечивали объемную скорость 1 мл/мин. Обнаружение проводили с помощью детектора по флуоресценции (возбуждение при 399 нм, испускание при 615 нм). Стартовые условия и профиль градиента могли несколько меняться при переходе от одной колонки к другой вследствие различий в их характеристиках.

При использовании описываемого метода ВЭЖХ пробу мочи после простой фильтрации вводили непосредственно в колонку, причем предколонка не применялась. Типичная хроматограмма мочи больного порфирией cutanea tarda приведена на рис. 10.10. Изокопро- и соответствующий копропорфирин III были отделены друг от друга и от копропорфирина I в описанных выше ус-

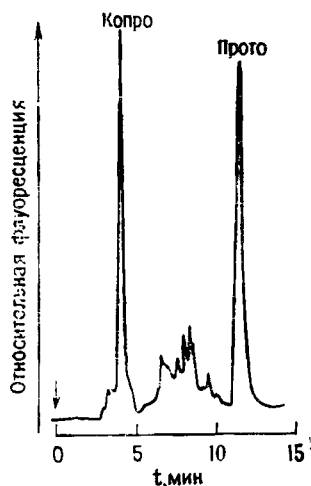


Рис. 10.13. Разделение на лихросорбе порфиринов кала больного *porphyria variegata*.

ловиях. Предел обнаружения составил 0,2 мг для уро- и 0,1 мг для копропорфирина. Этого вполне достаточно для количественного анализа порфиринов, входящих в состав мочи.

Для идентификации и количественного определения отдельных порфиринов авторы работы [64] использовали метод введения в пробы мочи определенных количеств стандартных смесей порфиринов. На хроматограммах мочи больных острой трансмитирующей порфирией наблюдаются два заметных пика — уро- и копропорфирина (рис. 10.11, а). Сравнение хроматограммы этой пробы мочи с хроматограммой стандартной смеси (рис. 10.11, б) подтверждает, что копропорфирин содержит 95% изомера III.

Кал. Авторы этой главы [40] первыми провели разделение свободных порфиринкарбоновых кислот, содержащихся в кале, при помощи ВЭЖХ в условиях, подобных описанным. Обычно в кале содержатся поддающиеся обнаружению количества лишь таких порфиринов, которые имеют всего несколько карбоксильных групп. Разделение порфиринов осуществляли в мультилинейном градиенте 50—78% метанола в воде в течение 17 мин: колонка была такой же, как и при проведении анализа порфиринов мочи (неподвижная фаза — μ -бондапак). На рис. 10.12 показана хроматограмма экстракта кала больного эритрогепатической протопорфирией, полученная описанным выше методом.

Разделение порфиринов кала проводилось также с использованием системы из 3-см предколонки с обращенной фазой и колонки размером 25×0,46 см с лихросорбом RP-18. В этом случае элюирование велось в градиентном режиме смесью ме-

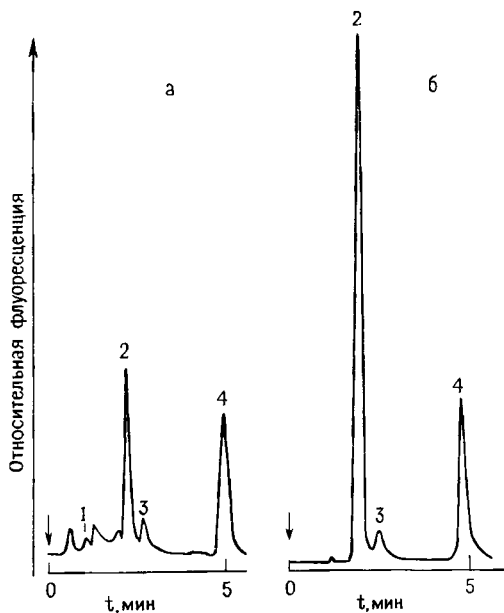


Рис. 10.14. Разделение порфиринов цельной крови при помощи ион-парной обращенно-фазовой хроматографии с октаметилловым эфиром уропорфирина в качестве стандарта [41].

а — нормальная кровь; *б* — кровь после отравления свинцом.
1 — копропорфин; 2 — Zn-протопорфин; 3 — протопорфин; 4 — внутренний стандарт.

танол/вода (от 65 до 90% метанола в течение 12 мин). Время удерживания было гораздо меньше, чем при разделении на колонке с μ -бондапаком, что демонстрирует хроматограмма, приведенная на рис. 10.13.

Кровь. Авторы работы [41] описали разделение порфиринов, содержащихся в образцах цельной крови, методом ион-парной ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (μ -бондапак C_{18}). Элюентом служила смесь 50 мМ водного раствора гидроксида тетрабутиламмония, значение pH было доведено до 7,5 фосфорной кислотой с ацетонитрилом (34:66). Объемная скорость составляла 2 мл/мин. Обнаружение осуществляли при помощи детектора по флуоресценции (длина волны возбуждения 400 нм, испускания >560 нм). Пробы крови вводили непосредственно после гемолиза эритроцитов на предколонку, заполненную поверхностно-пористой неподвижной фазой C_{18} . Внутренним стандартом служил октаметилловый эфир уропорфирина, который растворяли в лизирующем реагенте.

Хроматографический анализ состава нормальной крови показал, что среди порфиринов преобладает цинк-протопорфин IX, который хорошо отделяется от протопорфина IX (рис. 10.14).

Другие материалы. Используя в принципе такую же систему, которая была применена для разделения мочи, лишь заменив спирт, авторы работы [31] смогли разделить смеси синтети-

ческих и природных порфиринов. Проведение методом ВЭЖХ разделения порфиринов, содержащихся в экстрактах глубоководных морских медуз, показало, что основной его компонент — протопорфирин. Элюирование в данном случае велось смесью этанол/вода (17:3). Элюирование смесью метанол/вода (85:15) позволило разделить компоненты смеси «гематопорфириновых производных» фоточувствительных соединений, применяемых в клинических исследованиях раковых заболеваний [65].

10.3.2.2. Другие примеры разделения на обращенных фазах.
Моча. В 1979 г. авторы работы [34] предложили методику определения свободных порфиринов в моче при помощи ВЭЖХ. Согласно этой методике, разделение проводилось с использованием системы из двух колонок — предколонки ($5 \times 0,46$ см) с обращенной фазой и основной колонки с μ -бондапаком C_{18} . На предколонке порфирины отделялись от других флуоресцирующих (непорфириновых соединений): порфирины улавливались, а все прочие соединения элюировались, после чего порфирины поступали на основную колонку, где и осуществлялось их разделение. Подкисленную пробу мочи наносили на предколонку и элюировали пробу сначала 15%-ным раствором ацетонитрила в 0,01 М фосфатной кислоте и далее только фосфорной кислотой. После этого предколонку уравнивали 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,5) до того момента, пока рН элюента на выходе из колонки не достигал 6. После этого предколонку соединяли с основной колонкой и проводили на последней разделение при градиентном элюировании ацетонитрилом в фосфатном буфере (от 0 до 50% ацетонитрила в течение 30 мин). Объемная скорость во всех случаях составляла 1 мл/мин. Разделение проб, содержащих серии порфиринов от уро- до копропорфина, было достаточно эффективным — разделялись даже изомеры копропорфина I и III. Для обнаружения использовался детектор по флуоресценции (длина волны возбуждения 400 нм, испускания 650 нм). Следует отметить, однако, что данный метод разделения довольно сложен и трудоемок, он требует применения нескольких элюентов, точности в переключении потока, а длительность анализа составляет более 100 мин.

Та же группа исследователей с успехом провела скоростное разделение синтетической смеси изомеров свободного уропорфина на том же оборудовании [66]. Порфирины адсорбировались на предколонке по методу, описанному в работе [34]. Если элюентом служит 4%-ный раствор ацетонитрила в 10 мМ фосфатном буферном растворе (рН 6,5), то изомеры I—IV можно разделить при элюировании со скоростью 0,9 мл/мин (рис. 10.15). Однако изомеры II и IV в этих условиях разделяются лишь отчасти. Разделить содержащиеся в образцах мочи уропорфирины I и III можно, увеличивая концентрацию ацето-

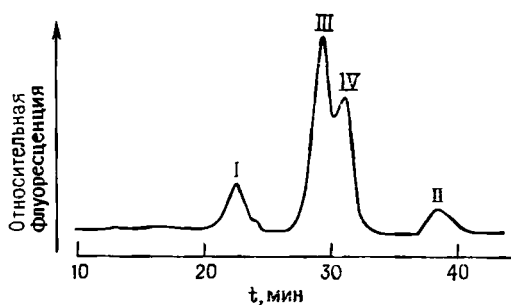


Рис. 10.15. Хроматограмма синтетической смеси изомеров I—IV свободного уропорфирина [66].

нитрила до 5% и повышая объемную скорость до 1 мл/мин. Менее чем за 15 мин в указанных условиях удалось получить хорошо разрешенные (почти до нулевой линии) пики изомеров.

Боммер [67] модифицировал метод Вайана и др. [86] и применил его для рутинного хроматографического разделения изомеров I и III уропорфирина. Хроматографирование проводилось на колонке с μ -бондапаком при элюировании 5%-ным раствором ацетонитрила в 10 мМ растворе фосфата натрия (рН 6,85) с объемной скоростью 1 мл/мин. Все изомеры при хорошем разрешении элюировались в течение 10 мин (рис. 10.16).

Для выделения свободных порфиринов мочи авторы работы [35] использовали колонки с обращенными фазами (колонка, заполненная μ -бондапаком C_{18} и предколонка размером $2,3 \times 0,4$ см). Элюирование проводили в градиентном режиме, повышая концентрацию метанола в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 3,5) от 55 до 100% при объемной скорости 1 мл/мин. Градиент создавался при помощи двух насосов. Обнаружение осуществлялось по флуоресценции (длина волны возбуждения 420 нм, испускания 510 нм). Детектор был снабжен светофильтром с узкой полосой пропускания. На хроматограммах образцов мочи наблюдается заметный фоновый сигнал и очень большое число непорфириновых флуоресцирующих соединений, четко отделенных от порфиринов.

Разделению свободных порфиринов мочи при помощи обращенно-фазовой хроматографии посвящены два реферата [68, 69]. В одном из них описано разделение свободных порфиринов на неподвижной фазе ODS-силекс I при элюировании смесью 0,01%-ная уксусная кислота/метанол (36:61). Для обнаружения применялся детектор по флуоресценции. Однако детального описания методики в работе [68] не приведено. Авторы работы [69] использовали колонку с μ -бондапаком фенилом и элюирование 64%-ным раствором метанола в воде, содержащим 15,6 мМ пентансульфоинвой кислоты и 10 мМ этилендиамин-

тетраацетата натрия. Никакие другие детали, особенно касающиеся качества разделения, не приводятся.

Кровь. В ходе исследования кислотного гидролиза диметилового эфира протопорфирина IX авторы работы [50] разработали ВЭЖХ-метод разделения свободных порфиринов и их метиловых эфиров на обращенных фазах (μ -бондапак C_{18}), позволяющих также проводить разделение порфиринов, входящих в состав крови. Порфирины, содержащие меньшее число карбоксильных групп, разделяли при помощи градиентного элюирования, начиная от смеси метанол/вода/ледяная уксусная кислота (6:4:1) до смеси метанол/ледяная уксусная кислота (10:1) при объемной скорости

2 мл/мин. Конечный состав смеси достигался через 13,7 мин, и в это время элюировался протопорфин IX. Для обнаружения был применен детектор по флуоресценции со светофильтром с узкой полосой пропускания, длина волны возбуждения составила 404 нм, испускания 595 нм. Гидролиз диметилового эфира протопорфирина IX заканчивался в течение 2—3 ч, дальнейшее увеличение времени обработки кислотой приводило к разложению протопорфирина. Авторы этой статьи показали, что метод ВЭЖХ пригоден для разделения свободных порфиринов, содержащихся в экстрактах крови.

Салми и Тенхунен [51], используя те же хроматографические условия, исследовали состав порфиринов эритроцитов. Они показали, что таким способом можно обнаружить только прото- и копропорфин, поскольку Zn-протопорфин разрушается в процессе очистки пробы, включающей экстракцию сильными минеральными кислотами. В качестве внутреннего стандарта эти авторы использовали флуоресцеин. Градиентное элюирование проводилось по методике, описанной в работе [50], при объемной скорости 1 мл/мин. После достижения конечного состава элюента, на что затрачивалось 10 мин, элюирование проводилось еще 4 мин. На примере стандартной смеси, состоящей из уро- и мезопорфирина, была показана возможность эффективного разделения смеси порфиринов на отдельные соединения методом ВЭЖХ с обнаружением по флуоресценции.

Авторы работы [48] предложили метод определения Zn-протопорфирина и протопорфирина IX в экстракте проб цельной крови. Метод основан на хроматографическом разделении пор-

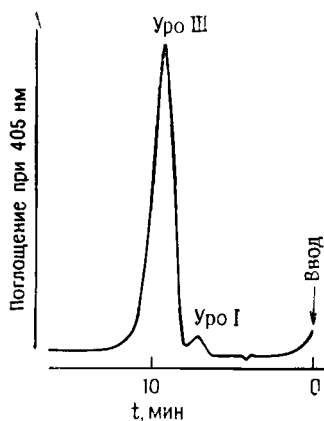


Рис. 10.16. Быстрое разделение смеси изомеров I и III уропорфина (для рутинного анализа) [67].

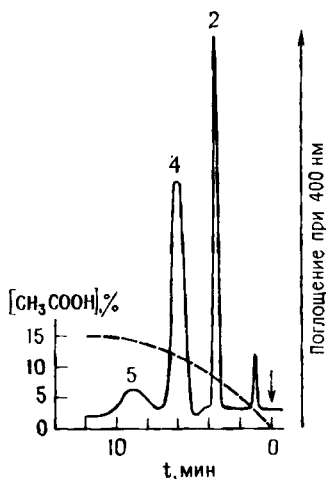


Рис. 10.17. Разделение порфиринди- (2), порфиринтетра- (4) и порфиринпентакарбоновых (5) кислот (профиль градиента показан штриховой линией) [15].

фиринов на колонке с μ -бондапаком C_{18} в условиях изократического элюирования смесью метанол/уксусная кислота/вода (39 : 4 : 7, pH 3,4) при объемной скорости 2 мл/мин. Время удерживания протопорфирина составило всего лишь 5 мин. Описанную методику ВЭЖХ авторы работы сравнили с несколькими другими методами анализа порфиринов крови и показали, что она превосходит другие методы по селективности и чувствительности.

В работе [49] описано разделение порфиринов эритроцитов на колонке с μ -бондапаком C_{18} , объединенной с предколонкой, заполненной поверхностно-пористой неподвижной фазой ODS. Элюентом служил 8%-ный водный буферный раствор KH_2PO_4 (pH 3,4) в метаноле (8 : 92), элюирование осуществлялось в изократическом режиме с объемной скоростью 2 мл/мин. Обнаруживали протопорфирины флуориметрически при обычных длинах волн. Таким способом было осуществлено разделение мезо-, прото-, копро- и Zn-протопорфиринов. Хорошее разделение смеси свободных порфиринкарбоновых кислот достигалось всего за 6 мин. Выход протопорфирина и его Zn-хелатного комплекса превышал 90%. Экстракция порфиринов, содержащихся в пробах крови, проводилась тремя различными методами. Наилучшие выходы дала ВЭЖХ проб, полученных экстракцией смесью этилацетат/уксусная кислота (3 : 1).

10.3.2.3. Разделение при помощи ионообменной хроматографии. В 1975 г. Эванс и др. [15] описали пример разделения методом ионообменной хроматографии смеси порфириновых ди-, тетра- и пентакарбоновых кислот (рис. 10.17). Разделение проводилось на колонке размером $90 \times 0,3$ см (внешн. диаметр), за-

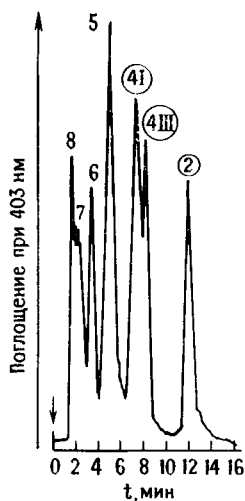


Рис. 10.18. Разделение стандартных смесей свободных порфиринкарбоновых кислот на колонке с силикагелем при градиентном элюировании смесью ацетон/разбавленная уксусная кислота (нумерация пиков та же, что на рис. 10.9) [43].

полненной поверхностно-пористым анионообменником AS пеллионекс SAX. Элюирование осуществлялось смесью уксусная кислота/метанол в градиентном режиме — от 0 до 15% уксусной кислоты в течение 15 мин. Указанный элюент был выбран потому, что его легко выпаривать перед масс-спектрометрическим анализом полученных фракций [21].

10.3.2.4. Разделение на силикагеле. Моча. В 1976 г. Адамс и др. [36] опубликовали методику разделения свободных порфиринов мочи на колонке с силикагелем силика А (13 мкм). Элюентом служил ацетон с 0,3% воды (рН доводили до 7,6 трибутиламин). При элюировании этой смесью разделение происходило в основном по механизму распределительной, а не адсорбционной хроматографии. Разделение изомеров I и III копро- и уропорфирина осуществляли в изократическом режиме при объемной скорости 2 мл/мин. Обнаружение проводили с помощью детектора по флуоресценции, длина волны возбуждения 403 нм, испускания 627 нм, предел обнаружения составлял 30 пг. Несмотря на высокую чувствительность метода в моче здоровых, а также больных порфирией были обнаружены только уро-, копропорфирины и небольшие количества порфириндикарбоновых кислот. Для мочи больных порфирией cutanea tarda характерно высокое содержание копропорфирина III. Однако, как известно, в моче больных этой болезнью содержатся большие количества уропорфирина и порфирингептакарбоновой кислоты.

Плазма крови. Аналогичные условия были выбраны для хроматографического разделения свободных порфиринов, содержа-

щихся в плазме крови [43]. Порфириновый экстракт растворяли в смеси ацетон/0,1 М соляная кислота и разделяли на колонке ($25 \times 0,3$ см) с силикагелем А. Элюирование проводили в градиентном режиме, повышая в течение 25 мин концентрацию уксусной кислоты в ацетоне от 2 до 90%. Объемная скорость составляла 0,5 мл/мин. Отдельные порфирины после разделения обнаруживали по флуоресценции (возбуждение при 400 нм, испускание при 602 нм). При разделении широкоиспользуемой стандартной смеси, содержащей смесь порфиринов от уро- до мезопорфиринов разрешение пиков порфиринов с 6—8 карбоксильными группами было довольно плохим. Пики изомеров I и III копропорфирина разрешены очень слабо.

10.4. Обнаружение

Во введении к данной главе отмечалось, что порфирины обладают очень характерными спектральными свойствами, поэтому практически все методы их качественного и количественного определения основаны на использовании спектрометрии. Поскольку в настоящее время исследователи располагают различными УФ- и флуоресцентными детекторами, обнаружение порфиринов после их разделения методом ВЭЖХ можно проводить при таких длинах волн, которые соответствуют их характеристическому поглощению.

10.4.1. УФ-поглощение

Высокий молярный коэффициент поглощения, отвечающий полосе Соре, позволяет осуществлять обнаружение элюируемых соединений с большой чувствительностью. Положение максимума полосы Соре для различных порфиринов меняется незначительно (табл. 10.1), поэтому на практике обнаружение проводят при некоторой средней одной и той же длине волны, лежащей в диапазоне между 400 и 410 нм. Это обеспечивает оптимальную чувствительность обнаружения практически всех порфиринов. Предел обнаружения можно понизить, используя порфириновые хелатные комплексы меди, которые характеризуются максимальным коэффициентом поглощения [56]. Предел обнаружения в данном случае находится на нанogramмовом уровне (около 10 нг) [45]. Непорфириновые соединения также поглощают в области полосы Соре и могут в ряде случаев мешать обнаружению порфиринов.

10.4.2. Флуоресценция

Метод обнаружения по флуоресценции отличается большей чувствительностью и селективностью, чем спектрофотометрический. Последнее обусловлено тем, что конкретные значения ха-

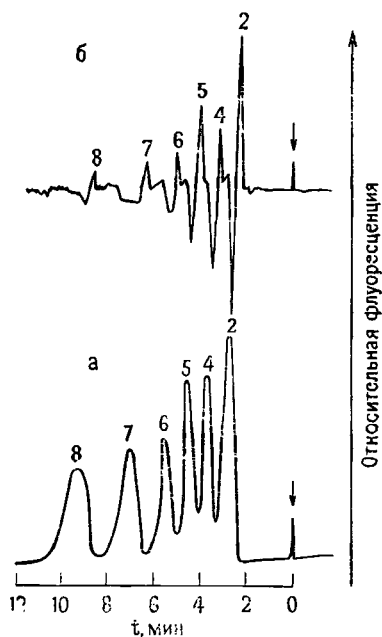


Рис. 10.19. Разделение метиловых эфиров порфиринов (2—8 карбоксильных групп) и обнаружение на основе производной нулевого (а) и второго порядка (б) сигнала детектора по флуоресценции (нумерацию пиков см. на рис. 10.7) [72].

рактистических длин волн возбуждения и испускания присущи лишь немногим соединениям или классам соединений [70]. Для обнаружения порфиринов в большинстве случаев используют длину волны возбуждения в области полосы Soret, а испускание измеряют при 600—630 нм или применяют светофильтр на 580—600 нм. В результате при таком способе обнаружения в поступающем из колонки элюате можно обнаруживать весьма небольшие количества порфиринов — вплоть до 30 пг [36]. Контроль за изменением во времени длины волны испускания в процессе разделения обеспечивает еще большее увеличение чувствительности и селективности обнаружения порфиринов с существенно различным положением максимумов испускания, например, прото- и Zn-протопорфиринов (табл. 10.1) [71].

По флуоресцентным спектрам возбуждения и испускания элюируемых фракций, получаемых по методу прерывания потока, можно осуществить идентификацию отдельных порфиринов [36].

10.4.2.1. Обнаружение по второй производной сигнала флуоресцентного детектора. Авторы работы [72] предложили интересный подход, основанный на определении второй производной интенсивности сигнала детектора по флуоресценции. Этот под-

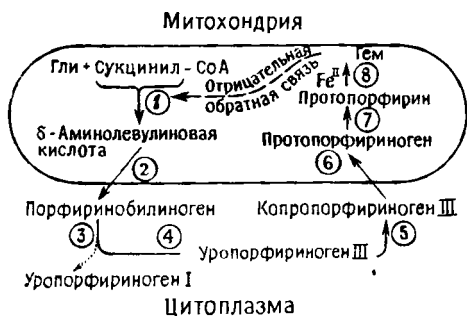


Рис. 10.20. Схема биосинтеза гема.

1 — δ-аминолевулилат-синтаза; 2 — порфиринобилиноген-синтаза; 3 — уропорфиринобилиноген-синтаза; 4 — уропорфириноген-коксиназа; 5 — уропорфириноген-декарбоксилаза; 6 — копропорфириноген-оксидоза; 7 — протопорфириноген-оксидоза; 8 — феррохелатаза.

ход был применен для определения эфиров порфиринов, выделенных из культуры клеток печени эмбрионов цыплят. Элюат, содержащий разделенные на колонке с партисилом 5 эфиры порфирина, контролировался флуориметрически (длина волны возбуждения 405 нм, испускания 430 нм). Вторая производная была получена при помощи ЭВМ из исходной хроматограммы нулевого порядка (рис. 10.19). Вторая производная хроматограммы увеличивает разрешение пиков и чувствительность обнаружения, последнее, впрочем, справедливо только для пиков с большой или, напротив, с маленькой высотой, как показано на примере метилового эфира уропорфирина (рис. 10.19).

10.5. Применение ВЭЖХ для диагностики порфирий

Подробные сведения о заболеваниях порфириями приведены в медицинской литературе [73, 74]. Клинические симптомы позволяют только установить общий характер заболевания, так как отдельные формы порфирий имеют сходные признаки, как, например, различные формы острой гепатической порфирии. Однако чтобы правильно вести лечение этих заболеваний, их необходимо дифференцировать.

10.5.1. Состав порфиринов при порфириях

Причина возникновения порфирии — пониженная активность фермента (или фактора) биосинтеза гема. Недостаточность фермента приводит к повышенному синтезу δ-аминолевулиновой кислоты, контролируемому по механизму отрицательной обратной связи (рис. 10.20). Это в свою очередь приводит к избыточному синтезу предшественников порфирина и порфириногенов, расположенных в биосинтетическом пути на этапе, предшествующем ферментативному блоку. Накапливающиеся порфириногены обнаруживаются в моче и (или) кале и окисляются там до соответствующих порфиринов, тогда как предшественники порфирина выделяются только с мочой.

Таблица 10.2. Снижение активности ферментов при заболевании порфирией и содержание порфиринов

Вид порфирии	Ферменты, активность которых снижается	Увеличение содержания предшественников	Увеличение содержания порфиринов			Номер рисунка, на котором приведена хроматограмма
			в моче	в кале	в крови	
I. Печеночная <i>P. cutanea tarda</i>	Уропорфириноген-декарбоксилаза	Нет	+—++	+	Нет	10.10, 10.22
Острая интермиттирующая <i>P. variegata</i>	Уропорфобилиноген-синтаза	Нет ++	Нет —+	Нет	»	10.11
	Протопорфириноген-оксидаза, феррохелатаза	Нет ++	Нет —+	+	»	10.13
Врожденная копропорфирия	Копропорфириноген-оксидаза	Нет ++	+	+	»	10.5
II. Эритропоэтическая Болезнь Гюнтера	Уропорфириноген-косинтаза	Нет	+	+	+	10.6
Эритрогепатическая протопорфирия	Феррохелатаза	»	Нет	+	+	10.12
III. Отравление свинцом	Феррохелатаза, порфобилиноген-синтаза	+	Нет —+	+	+	10.14

10.5.1.1. Хроническая порфирия (*porphyria cutanea tarda*). Этим видом порфирии страдают более половины всех больных порфириями. Причиной служит врожденный дефицит активности фермента уропорфириноген-декарбоксилазы в клетках печени (табл. 10.2). Нарушение обычного механизма биосинтеза приводит к образованию значительных количеств уропорфирина и порфирингептакарбоновой кислоты и повышенному их содержанию в моче, о чем, в частности, свидетельствуют хроматограммы, полученные при разделении порфиринов мочи (рис. 10.10, 10.21). Те же порфирины обнаруживают и в кале, однако порфиринтетракарбоновая фракция в этом случае имеет более сложный состав и содержит избыток копро- и изокопропорфирина (рис. 10.22). Наличие изокопропорфирина в кале — характерный признак порфирии данного вида.

10.5.1.2. Острая интермиттирующая порфирия. При заболеваниях этим видом порфирии содержание порфирина в моче периодически (во время обострения болезни) возрастает, а в

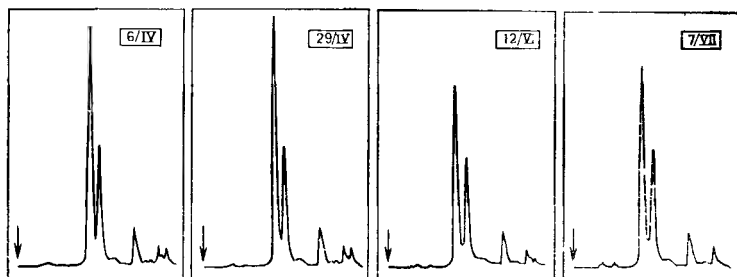


Рис. 10.21. Хроматограммы порфиринов больного *porphyria tarda*, наблюдаемого в течение трех месяцев.

кале остается постоянным и примерно соответствующим нормальному. Увеличение концентрации предшественников порфирина в моче в периоды обострения служит важным диагностическим признаком.

10.5.1.3. *Porphyria variegata*. Этот редко встречающийся вид порфирии характеризуется значительным увеличением содержания прото- и копрпорфирина в кале (их относительное содержание меняется от 2:1 до 1:1). В периоды спокойного течения болезни часто наблюдается повышенное содержание в моче копропорфирина и в несколько меньшей степени уропорфирина, а в период обострения болезни содержание последнего значительно возрастает, что отчасти обусловлено неферментативной конверсией порфобилиногена.

10.5.1.4. Врожденная копропорфирия. Это распространенная разновидность острой печеночной порфирии, характерным признаком которой служит увеличение концентрации копропорфирина в моче, в основном изомера III (рис. 10.5), и кале. Накоп-

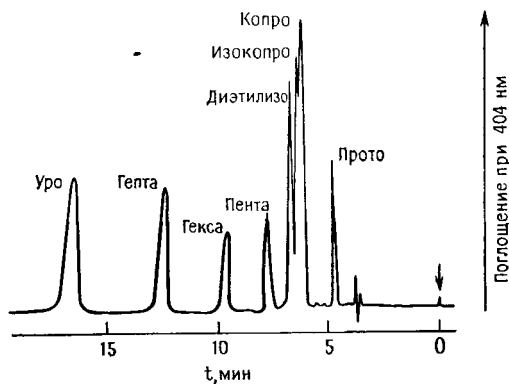


Рис. 10.22. Хроматограмма метиловых эфиров порфиринов, содержащихся в кале больного *porphyria cutanea tarda* [19].

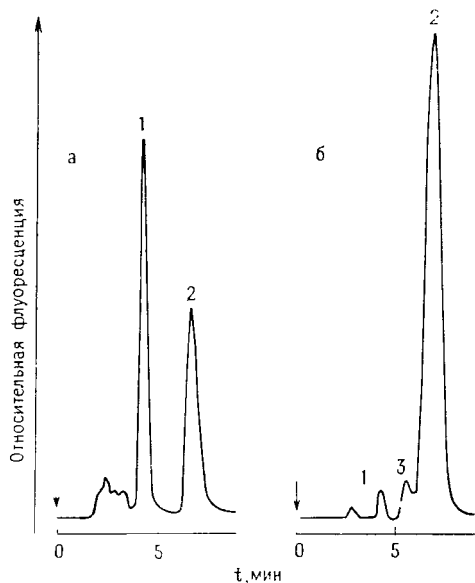


Рис. 10.23. Разделение при помощи нон-парной обращенно-фазовой хроматографии порфиринов, содержащихся в эритроцитах.

a — стандартная смесь порфиринов, добавленная к гемолизату эритроцитов; *b* — проба крови больного эритрогенатической протопорфирией. 1 — Zп-протопорфин; 2 — протопорфин; 3 — мезопорфин.

ление порфиринов в эритроцитах наблюдают в случае всех видов эритропоэтической порфирии, а также при отравлениях свинцом (табл. 10.2).

10.5.1.5. Врожденная эритропоэтическая порфирия. Этот вид порфирии, известный также как болезнь Гюнтера, встречается очень редко. Сопровождается она существенным увеличением содержания уропорфирина в моче, причем содержание копропорфирина и других порфиринов тоже увеличивается (рис. 10.6). Концентрация копропорфирина увеличивается довольно заметно, а иногда в кале отмечают и увеличение содержания уропорфирина. Все порфирины находятся в форме изомера I, что отражает снижение активности фермента уропорфириноген-косинтазы при заболевании этим видом порфирии.

10.5.1.6. Эритрогенатическая протопорфирия. Для этого вида порфирии характерно экстремально высокое содержание протопорфирина в кале (рис. 10.12), а дополнительным признаком заболевания обычно служит повышенное содержание протопорфирина в эритроцитах (рис. 10.23). Состав и содержание порфиринов в моче, как правило, остается неизменным, если только заболевание не приводит к нарушению функции печени. В этом случае состав порфиринов в моче становится таким же, как при заболевании *porphyria cutanea tarda*.

10.5.1.7. Отравление свинцом. При отравлении свинцом наблюдается резкое увеличение содержания Zn-протопорфирина в эритроцитах (рис. 10.14, б), а также некоторое, незначительное, увеличение содержания копро- и протопорфиринов. Очень важный диагностический признак — высокая концентрация δ -аминолевулиновой кислоты в моче.

10.5.2. Рекомендации для выбора метода лабораторного диагностирования

Клинические симптомы порфирий различного вида чрезвычайно неустойчивы, поэтому решающую роль при выявлении этих заболеваний играют результаты определения качественного и количественного состава порфиринов в крови, моче и (или) кале. Проведение исследования методом ВЭЖХ всех разновидностей проб не рекомендуется из-за относительно высокой стоимости таких исследований и довольно высокой вероятности получения отрицательных результатов. Наиболее целесообразной мы считаем следующую методику.

Проведение скрининга мочи пациентов с целью выявления проб с повышенным содержанием порфиринов и их предшественников с использованием ионообменной хроматографии или УФ-спектроскопии по вторым производным (полосы поглощения *Soret*). Последующий анализ образцов мочи с повышенным содержанием порфиринов при помощи ВЭЖХ. Количественное обнаружение порфиринов и их предшественников. И наконец, анализ проб крови и кала при помощи ВЭЖХ, который необходим только в тех случаях, когда требуется уточнить диагноз или подтвердить заболевание редкой формой порфирии (например, *porphyria variegata* или *erythrohepatic protoporphyria*). При обоснованных подозрениях на отравление свинцом необходим анализ порфиринов эритроцитов.

Помимо того что ВЭЖХ может использоваться как один из диагностических приемов, она позволяет следить за течением болезни и эффективностью ее лечения. Возможность наблюдения за состоянием больного на основе данных хроматографического разделения порфиринов мочи демонстрирует рис. 10.21 (наблюдение проводили в течение трех месяцев). Больной по его желанию в этот период лечению не подвергался. Абсолютное количество порфиринов в моче больного менялось в зависимости от объема выделяемой в течение суток мочи и интенсивности процесса. Однако их относительное содержание оставалось постоянным.

Следует подчеркнуть, что для диагноза заболеваний порфириями важно установить не абсолютное содержание порфири-

на того или иного вида, а относительное изменение состава их смеси. Поэтому нет необходимости определять абсолютное количество индивидуальных порфиринов, выделяемых с мочой в течение суток.

Определение при помощи ВЭЖХ состава порфиринов, содержащихся в экскрементах человека и биологических жидкостях, позволяет получить воспроизводимые и точные данные. Можно ожидать, что методика подготовки проб к анализу в скором времени будет усовершенствована, условия разделения оптимизированы, а качество хроматографического оборудования и колонок повышено. Все это приведет к тому, что хроматографический метод анализа порфиринов найдет самое широкое применение в клинической химии и биохимии.

Литература

1. Hoppe-Seyler F., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 4, 193 (1879).
2. Treibs A. (ed.): Das Lebens und Wirken von Hans Fischer. Hans Fischer Gesellschaft, München (1971).
3. Rimington C., Roets G. C. S., Fourie P. J. J. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind., 10, 421 (1938).
4. Rimington C., Sveinsson S. L. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2, 209 (1950).
5. Schwartz S., Zieve L., Watson C. J. J. Lab. Clin. Med., 37, 843 (1951).
6. Grinstein M., Schwartz S., Watson C. J. J. Biol. Chem., 157, 323 (1945).
7. With T. K. Clin. Biochem. (Montreal), 1, 30 (1967).
8. Doss M. Klin. Wochenschr., 47, 1280 (1969).
9. Seubert A., Seubert S., Ippen H., Drsch. Med. Wochenschr., 104, 1459 (1979).
10. Nacht S., San Martin De Viale L. C., Grinstein M. Clin. Chim. Acta, 27, 445 (1970).
11. Lockwood W. H., Davis J. L. Clin. Chim. Acta, 7, 301 (1962).
12. Falk J. E., Dresel E. L. B. Biochim. Biophys. Acta, 39, 458 (1960).
13. Schmitt A. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 15, 303 (1977).
14. Scheer H., Katz J. J., in: Smith K. M. (Ed.): Porphyrins and Metalloporphyrins, p. 399. Elsevier, Amsterdam 1975.
15. Evans N., Games D. E., Jackson A. H., Matlin S. A. J. Chromatogr., 115, 325 (1975).
16. Willstätter R., Fischer M. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 87, 423 (1913).
17. Soret J.-L. Arch. Sci. Phys. Nat., 10, 430 (1883).
18. Evans N., Jackson A. H., Matlin S. A., Towill R. J. Chromatogr., 125, 345 (1976).
19. Gray C. H., Lim C. K., Nicholson D. C. Clin. Chim. Acta, 77, 167 (1977).
20. Christensen N. G., Romslo I. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 39, 223 (1979).
21. Matlin S. A., Jackson A. H., Evans N., in: Reid E. (Ed.): Methodological Development in Biochemistry, v. 5, p. 45, North Holland, Amsterdam, 1976.
22. Wilson J. H. P., Van Den Berg J. W. O., Edixhoven-Bosdijk A., Van Gastel Quist L. H. M. Clin. Chim. Acta, 89, 165 (1978).
23. With T. K. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl., 32, 134 (1973).
24. Petryka Z. J., Pierach C. A. J. Chromatogr. Sci., 10, 103 (1979).
25. Petryka Z. J., Watson C. J. Anal. Biochem., 84, 173 (1978).
26. Lim C. K., Gray C. H., Stoll M. S., in: Doss M. (Ed.): Porphyrins in Human Diseases, p. 472. Karger, Basel, 1976.
27. Schoofs T., Gossler K., Scheller K. H., GIT Fachz. Lab., 22, 610 (1978).

28. Elder G. H. Clin. Haematol., **9**, 371 (1980).
29. Straka J. G., Kushner J. P., Burnham B. F. Anal. Biochem., **111**, 269 (1981).
30. Fuhrhop J. M., Smith K. M., in: Smith K. M. (Ed.): Porphyrins and Metalloporphyrins, p. 835. Elsevier, Amsterdam, 1975.
31. Bonnett R., Charalambides A. A., Jones K., Magnus I. A., Ridge R. J. Biochem. J., **173**, 693 (1978).
32. Meyer H. D., Jacob K., Vogt W. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **3**, 85 (1980).
33. Meyer H. D., Jacob K., Vogt W., Knedel M. J. Chromatogr., **199**, 339 (1980).
34. Englert E. Jr., Wayne A. W., Wales E. E. Jr., Straight R. C. J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., **2**, 570 (1979).
35. Ford R. E., Ou C.-N., Ellefson R. D. Clin. Chem., **27**, 397 (1981).
36. Adams R. F., Slavin W., Rhys Williams A. Chromatogr. News, **4**, 24 (1976).
37. Carlson R. E., Dolphin D. in: Dixon P. E., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. (Eds.): HPLC in Clinical Chemistry, p. 87. Academic Press, London 1976.
38. Rimington C., With T. K. Enzyme, **7**, 17 (1974).
39. With T. K. Scand. J. Clin. Lab. Invest., **38**, 501 (1978).
40. Meyer H. D., Jacob K., Vogt W., Knedel M. J. Chromatogr., **217**, 473 (1981).
41. Gotelli G. R., Wall J. H., Kabra P. M., Marton L. J. Clin. Chem., **26**, 205 (1980).
42. Jackson A. H., Jones D. M., Philip G., Lash T. D., Del C. Battle A. M., Smith S. G. J. Biochem., **12**, 681 (1980).
43. Longas M. O., Poh-Fitzpatrick M. B., Anal. Biochem., **104**, 268 (1980).
44. Cavaleiro J. A. S., Kenner G. W., Smith K. M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, **1974**, 1188 (1974).
45. Malina L., Miller V., Magnus I. A. Clin. Chim. Acta, **83**, 55 (1978).
46. Richter M. L., Riets K. G. FEBS Lett., **116**, 211 (1980).
47. Lamola A. A., Yamane T. Science, **186**, 936 (1974).
48. Smith R. M., Doran D., Mazur M., Bush B. J. Chromatogr., **181**, 319 (1980).
49. Scoble H. A., McKeag M., Brown P. R., Kavarnos G. J. Clin. Chim. Acta, **113**, 253 (1981).
50. Culbreth P., Walter G., Carter R., Burtis C. Clin. Chem., **25**, 605 (1979).
51. Salmi M., Tenhunen R. Clin. Chem., **26**, 1832 (1980).
52. Carlson R. E., Dolphin D., in: Doss M. (Ed.): Porphyrins in Human Diseases, p. 465. Karger, Basel 1976.
53. Evans N., Jackson A. H., Matlin S. A., Towill R., in: Dixon P. E., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. (Eds.): HPLC in Clinical Chemistry, p. 71. Academic Press, London 1976.
54. Gray C. H., Lim C. K., Nicholson D. C., in: Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. (Eds.): HPLC in Clinical Chemistry, p. 79. Academic Press, London, 1976.
55. Hörchner P., Rietveld T. J. Chromatogr., **123**, 414 (1976).
56. Miller V., Malina L. J. Chromatogr., **145**, 290 (1978).
57. Jackson A. H., Sancovich H. A., Ferramola De Sancovich A. M. Bioorg. Chem., **9**, 71 (1980).
58. Elder G. H., Evans J. O., Jackson J. R., Jackson A. H. Biochem. J., **169**, 215 215 (1978).
59. Jackson A. H., Rao K. R. N., Supphayen D. M., Smith S. G. J. Chem. Commun., **1977**, 696 (1977).
60. Battersby A. R., Buckley D. G., Hodgson G. L., Markwell R. E., McDonald E., in: Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K., Stoll M. S. (Eds.): HPLC in Clinical Chemistry, p. 63. Academic Press, London 1976.
61. Bommer J. C., Burnham B. F., Carlson R. E., Dolphin D. Anal. Biochem., **95**, 444 (1979).
62. Nordlöv H., Jordan P. M., Burton G., Scott A. I. J. Chromatogr., **190**, 221 (1980).
63. Walker I. C., Gilbert M. T., Stubbs K. J. Chromatogr., **202**, 491 (1980).

64. Franke J. P., DeZeeuw R. A. *Anal. Chem.*, **50**, 1374 (1978).
65. Bonnett R., Ridge R. J., Scourides P. A., Berenbaum M. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, 1198 (1980).
66. Wayne A. W., Straight R. C., Wales E. E. Jr., Englert E. Jr., *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr., Commun.*, **2**, 621 (1979).
67. Bommer J. C. Personal Communication (1982), unpublished data.
68. Adams R. F., Vandemark F. L. *Clin. Chem.*, **22**, 1180 (1976).
69. Needham L. L., Sirmans S. L., Liddle J. A., Bayse D. D. *Clin. Chem.*, **27**, 1099 (1981).
70. Slavin W., Rhys Williams A. T., Adams R. F. *J. Chromatogr.*, **134**, 121 (1977).
71. Meyer H. D., unpublished results.
72. Zelt D. T., Owen J. A., Mark G. S. *J. Chromatogr.*, **189**, 209 (1980).
73. *Clin. Haematol.*, Vol. **9** (2), (1982) (special issue on porphyrias).
74. Schreier K. (Ed.): *Die angeborenen Stoffwechselanomalien*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1979.

Стероидные гормоны

В. Вёльтер (W. Voelter)

11.1. Введение

Стероиды — это природные соединения с пергидроциклопентановым скелетом. Обозначение колец (А, В, С и D), а также принятая нумерация углеродных атомов показаны на примере структурной формулы холестерина (рис. 11.1).

Методы адсорбционной, колоночной распределительной, бумажной, тонкослойной и газо-жидкостной хроматографии уже с момента их появления играли важную роль в работах по химии стероидов. В последние же годы все более широкое применение для разделения и идентификации стероидов различной структуры находит высокоэффективная колоночная жидкостная хроматография, имеющая ряд преимуществ по сравнению с перечисленными методами. При этом широко варьируются условия разделения. Химия [1—4] и методы анализа [5—8] стероидов подробно рассматриваются в ряде монографий.

11.2. Андрогены и андростаны

Для андрогенов, мужских половых гормонов, характерно отсутствие боковой цепи в положении C₁₇. На рис. 11.2 представлены структуры некоторых андрогенов и их метаболитов.

Сиггиа и Дишман [9] более 10 лет назад разработали способ разделения андрогенов на гидрофобных носителях, покрытых неполярной неподвижной фазой, характеризующейся достаточно высокой разрешающей способностью (табл. 11.1).

В работах [10—14] описан анализ андрогенов с использованием обращенно-фазовых носителей с различной структурой и свойствами, включая ODS-пермафазу, нуклеосил CN и C₁₈, μ -бондапак, лихросорб RP-8 и лихросорб RP-18. Методом спектрофотометрии при длине волны 254 нм можно обнаруживать до 1 нг стероидов.

Пять главных метаболитов тестостерона, образующихся под действием микросомальной монооксигеназы печени, можно легко разделить методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 11.3) [15].

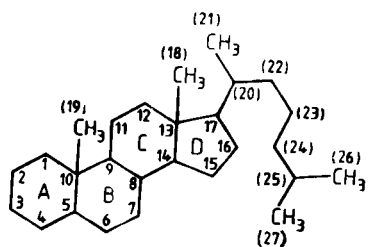


Рис. 11.1. Структура холестерина и общепринятая нумерация атомов углерода.

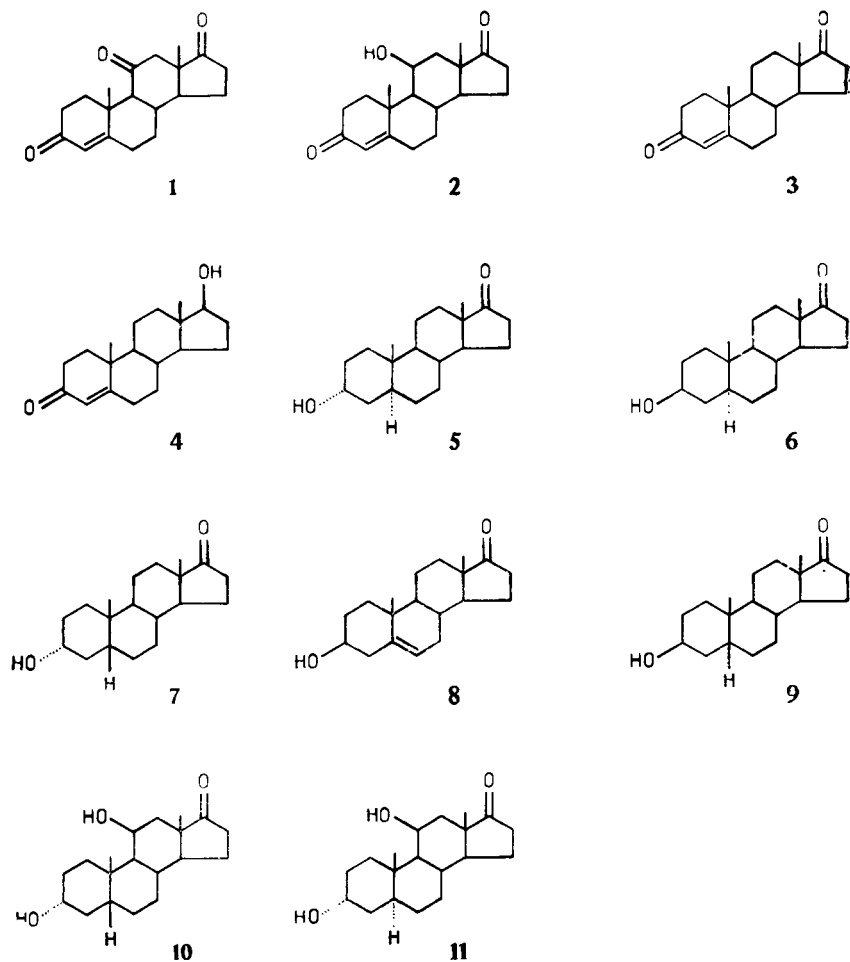


Рис. 11.2. Структура некоторых андростанов.

1 — андрост-4-ен-3,11,17-трион; 2 — андрост-4-ен-11β-ол-3,17-дион; 3 — андрост-4-ен-11,17-дион; 4 — тестостерон; 5 — андростерон; 6 — эпиандростерон; 7 — этиохоланолон; 8 — дегидроэпиандростерон; 9 — эпиэтиохоланолон; 10 — 11β-гидроксиэтиохоланолон; 11 — 11β-гидроксиандростерон.

Таблица 11.1. Время удерживания некоторых андрогенов при хроматографировании на амберлите LA-1 [9]

Колонка: 485×2 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: 24% LA-1^a на CTFE (терполимер трифторэтилена), 325 меш; элюент: вода; объемная скорость: 0,25 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 250 нм

Стероид	t_R , мин	Относит. t_R	R
Андрост-4-ен-3,11,17-трион	6,53	2,05	0,765
Андрост-4-ен-11 β -ол-3,17-дион	7,98	3,10	1,16
$\Delta^{1,4}$ -Андростаднен-17 β -ол-3-он	22,7	13,8	5,14
19-Норандрост-4-ен-3,17-дион	26,9	16,8	6,27
19-Нортестостерон	31,9	20,4	7,62
Андрост-4-ен-3,17-дион	57,2	38,8	14,5
Тестостерон	68,6	47,0	17,5

^a n-Додеканаль(триметил)амин.

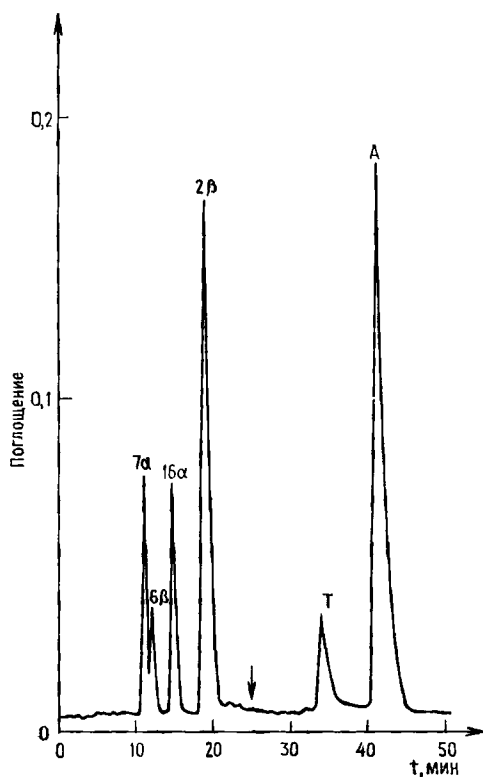


Рис. 11.3. Хроматограмма смеси гидроксильированных тестостеронов, тестостерона и андростендиона, полученная методом ВЭЖХ [15].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: C₁₈ (10 мкм); элюент: вначале метанол/вода (55 : 45), затем (показано стрелкой) метанол/вода/ацетонитрил (55 : 35 : 10); обнаружение: при 240 нм; объем пробы: 10 мкл; концентрация каждого из стероидов в пробе, ммоль/л: 2 β -гидрокситестостерон (2 β) 1,32, 6 β -гидрокситестостерон (6 β) 0,33, 7 α -гидрокситестостерон (7 α) 0,33, 16 α -гидрокситестостерон (16 α) 0,37, тестостерон (T) 0,33 и андростендион (A) 1,63.

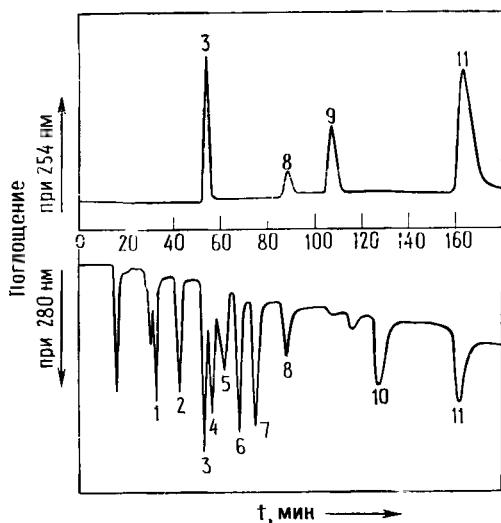


Рис. 11.4. Хроматограмма смеси андрогенов, полученная методом ВЭЖХ [20]. Колонка: 300×4,6 мм (внутр. диаметр), две секции; неподвижная фаза: партисил 5; элюент: дихлорметан/ацетонитрил/2-пропанол (179:20:1); объемная скорость: 0,4 мл/мин; обнаружение: при 280 и 254 нм (два последовательно соединенных детектора). 1 — 5 α -андростан-3,17-дион (андростандион) (37 мкг); 2 — 5 β -андростан-3,17-дион (этиохоландион) (39 мкг); 3 — андрост-4-ен-3,17-дион (андростендион) (34 мкг); 4 — 3 β -гидрокси-5 β -андростан-17-он (эпителиноланон) (196 мкг); 5 — 3 β -гидроксиандрост-5-ен-17-он (дегидроэпиандростерон) (188 мкг); 6 — 3 β -гидроксн-5 α -андростан-17-он (эпандростерон) (210 мкг); 7 — 3 α -гидроксн-5 α -андростан-17-он (андростерон) (214 мкг); 8 — андрост-1,4-диен-3,17-дион (андростадиенон) (6 мкг); 9 — 17 β -гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон) (42 мкг); 10 — 3 α -гидроксн-5 β -андростан-17-он (этиохоланолон) (297 мкг); 11 — 17 α -гидроксн-4-андростен-3-он (эпитестостерон) (99 мкг); ввод пробы осуществлялся методом остановки потока.

Этот же метод, как показано в работе [16], посвященной ацетатам некоторых 19-норстероидов (неподвижная фаза — лихосорб RP-8), пригоден для разделения ацетатов андростанов с хорошим разрешением. Переводя андростаны в соответствующие бензоаты, *p*-нитробензоаты [17] или 2,4-динитрофенилгидразоны [18], удается значительно снизить предел обнаружения этих соединений УФ-детектором. Для обнаружения андростанов, их сульфатов и глюкуронидов после разделения методом обращенно-фазовой распределительной хроматографии на микропакет СН при элюировании смесями метанол/вода [19] был применен рефрактометрический детектор. Элюирование свободных стероидов и их конъюгатов проходило в следующем порядке: дегидроэпиандростерон, эпандростерон, этиохоланолон и андростерон. Стероиды, содержащие экваториальную гидроксильную группу, как правило, более полярны, чем стероиды, содержащие аксиальную гидроксильную группу.

Обращенно-фазовая хроматография может быть также использована для препаративного разделения андростанов. Так,

на колонке с лихросорбом RP-18 проведено успешное разделение 7α - и 7β -метилпроизводных 17β -ацетоксандрост-4-ен-3-она и побочных продуктов, образующихся при реакции 17β -ацетоксандроста-4,6-диен-3-она с диметилкупратом лития [14].

Отличное разделение андрогенов возможно также методом адсорбционной ВЭЖХ (рис. 11.4) [20].

Δ^4 -3-Кетоны (III, VII и IX на рис. 11.4) сильно поглощают при 254 нм, что позволяет определить до 30 нг тестостерона при этой длине волны. Обнаружение 17-кетостероидов проводят в основном при длине волны 280 нм; однако чувствительность обнаружения в этом случае в 5 раз меньше чувствительности обнаружения Δ^4 -3-кетонов. Как следует из рис. 11.4, C_{19} -стероиды можно разделить на три следующие группы, элюирующиеся друг за другом из адсорбционной хроматографической колонки: 1) дикетоны (соединения I—III), 2) 3-гидрокси-17-кетоны (соединения IV—VII) и 3) 17-гидрокси-3-кетоны (соединения IX и XI). Более того, как известно, эпимерные стероиды разделяются лучше методом адсорбционной хроматографии, чем обращенно-фазовой распределительной хроматографии, исключение составляют лишь 17-эпимеры [21].

11.3. Эстрогены

Эстрогены — женские половые гормоны с ароматическим кольцом А в молекуле. Структура некоторых эстрогенов представлена на рис. 11.5.

Вследствие того что эстрогены сильно поглощают в УФ-области, сообщения об их разделении методом ВЭЖХ появились в литературе сравнительно рано [22]. Эстрогены и их производные были разделены как методом адсорбционной (зорбакс BP-SIL, μ -порасил, корасил 1, партисил 5 [23—26]), так и обращенно-фазовой (зорбакс BP-ODS, μ -бондапак C_{18} , лихросорб RP-8, сферисорб S5-ODS [26—32]) хроматографии. В табл. 11.2 сравниваются результаты, полученные при разделении природных эстрогенов на адсорбционных и обращенно-фазовых ВЭЖХ-колонках. Исходя из приведенных в таблице данных, можно сделать следующие выводы.

При разделении методом ВЭЖХ наиболее важную роль играют число и расположение гидроксильных групп в эстрогенах.

Введение кетогруппы в молекулу эстрогена значительно меньше увеличивает ее полярность в адсорбционной хроматографии по сравнению с обращенно-фазовой.

Эпимерные эстрогены при помощи адсорбционной хроматографии разделяются лучше, чем при использовании обращенно-фазовой хроматографии.

Порядок элюирования экстрогенов из обращенно-фазовой колонки не представляет собой обратную последовательность

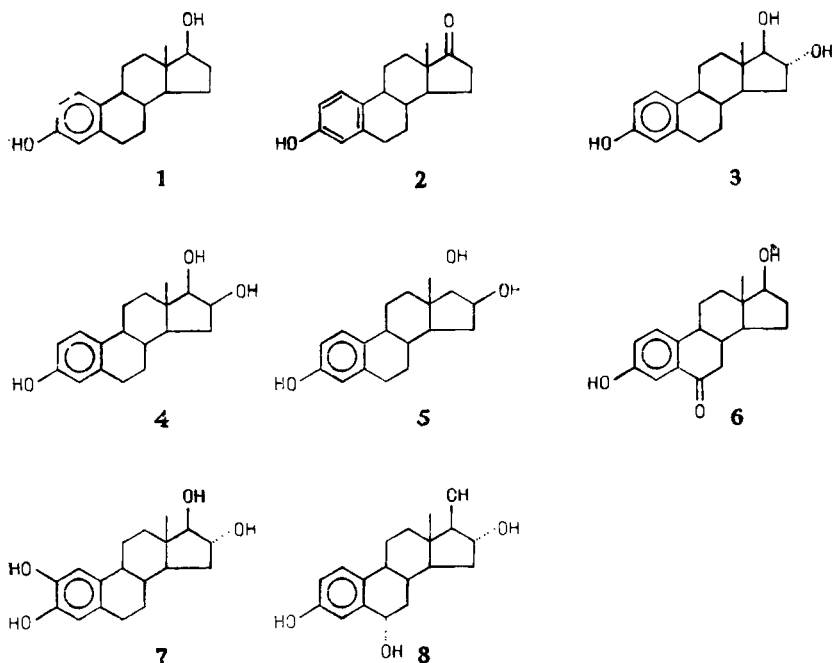


Рис. 11.5. Структуры некоторых эстрогенов.

1 — эстрадиол; 2 — эстрон; 3 — эстриол; 4 — 16-эпиестриол; 5 — 16,17-эпиестриол; 6 — 6-кетоестрадиол; 7 — 2-гидроксiestриол; 8 — 6 α -гидроксiestриол.

элюирования из адсорбционной колонки; следовательно, эти два метода дополняют друг друга.

Полярность гидроксильных групп в положениях C_{16} и C_{17} возрастает в ряду $17\alpha < 17\beta < 16\alpha < 16\beta$.

6-Кетоестрадиол более полярнен, чем 16-кетоестрадиол, при разделении методом адсорбционной хроматографии и менее полярнен, если разделение проводится методом обращенно-фазовой хроматографии.

Авторы работы [33—36] выполнили ряд детальных исследований процесса разделения конъюгатов эстрогенов методом ВЭЖХ с использованием колонок с ионообменной целлюлозой [33], μ -партицилом 10-SAX [34], лихросфером Si-100 [35] или лихросорбом RP-2 (RP-18) [36]. Наиболее обстоятельные исследования по применению ионообменных целлюлоз для разделения глюкуронидов, сульфатов и фосфатов эстрогенов выполнены ван дер Валом и Губером [33]. Свойства ряда ионообменных целлюлоз приведены в табл. 11.3.

Степень хроматографического разделения двух компонентов характеризуется разрешением R , которое зависит от парамет-

Таблица 11.2. Время удерживания (мин) эстрогенов при разделении различными вариантами метода ВЭЖХ [26]

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс BP-SIL (А, Б) и зорбакс BP-ODS (В, Г) (7–8 мкм); элюент: *n*-гексан/этанол (А — 9 : 1, Б — 97 : 3) и ацетонитрил/вода (В — 35 : 65, Г — 25 : 75); объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 280 нм; проба, мкг эстрогенов/50 мкл элюента: 1,5–10 (А), 1–10 (Б), 1–3 (В), 1–5 (Г)

Соединение	А	Б	В	Г
Моноспирты				
17-Дезоксэстрон		3,25	>75	
Эстрон		9,5	32	
6-Дегидроэстрон		9,5	28,5	
Эквилин		9,5	28,5	
Эквилинин		10,5	25,5	
Диолы				
Эстрадиол-17α		16,25	25,5	
Эстрадиол-17β	4,75	17,75	23	
2-Гидроксиэстрон		19,5 ^а	16	
6-Дегидроэстрадиол		20,25	18,5	
17α-Дигидроэквилин		22,5	18,5	
Эстрадиол-3,16α		22,5	21	
17α-Дигидроэквилинин		25,25	16	
16-Кетозэстрадиол		27,5	6,75	22,5
16α-Гидроксиэстрон		30,75	7,25	25,5
6-Кетозэстрадиол	6,75	32	7,25	25,5
Триолы				
16-Эпиэстриол	8,25		9,25	
17-Эпиэстриол	8,25		13,5 ^а	
2-Гидроксиэстрадиол	8,25 ^а		13,5	
Эстриол	11		4,25	13
6α-Гидроксиэстрадиол	11		4,25	10
Эпиэстриол-16,17	12,75		4,25	13
6-Кетозэстриол	16,75(15) ^б		2,5	6,25
Тетраолы				
2-Гидроксиэстриол	19,25 ^а		3,5	7,75
6α-Гидроксиэстриол	28		2,5	4

^а Широкие пики.

^б Образец дает маятниковый пик с временем удерживания 15 мин.

ров, входящих в уравнение (1):

$$R = (\alpha - 1) [k / (1 + k)] (n)^{1/2} \quad (1)$$

где α — селективность, k — коэффициент емкости, n — число теоретических тарелок, l — длина колонки, h — высота, эквивалентная теоретической тарелке.

Коэффициент емкости рассчитывают из времени удерживания компонента t_R и мертвого времени колонки:

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (2)$$

Таблица 11.3. Размер частиц и ионообменная емкость различных ионообменных целлюлоз, используемых для набивки колонок [33]

Анионообменник	Диаметр частиц в диапазоне от 10 до 90%, мкм	Средний диаметр частиц, мкм	Ионообменная емкость, ммоль/г
Целлекс PEI (полиэтилениминцеллюлоза)	7 до 17	11	0,21
Целлекс AE (аминоэтилцеллюлоза)	10 до 19	14	0,29
Целлекс T (триэтиламиноэтилцеллюлоза)	11 до 19	14	0,15
Целлекс GE (гуанидоэтилцеллюлоза)	—	—	—
В 300 (ECTEOLA-целлюлоза)	12 до 27	19	0,27
	9 до 19	13	0,27
	8 до 16	11	0,15
ET 41 (ECTEOLA-целлюлоза)	6 до 16	11	0,15
Целлекс E (ECTEOLA-целлюлоза)	7 до 16	11	0,17

Коэффициент емкости одного из компонентов можно определить, исходя из константы распределения K и фазового отношения β :

$$k = K\beta \quad (3)$$

Константу распределения K_X соединения X рассчитывают по уравнению (4) для ионообменного равновесия аниона X^- и диссоционного равновесия протонированной формы NH :

$$K_X = [X^-]_s / ([X^-]_m + [NH]_m) = K_1 / ([A^-]_m (1 + K_2 [H^+]_m)) \quad (4)$$

где $[X^-]_s$ — концентрация анионов компонента пробы на анионообменнике, $[X^-]_m$ — концентрация анионов компонента пробы в подвижной фазе, $[NH]_m$ — концентрация недиссоциированной формы компонента пробы в подвижной фазе, $[A^-]_m$ — концентрация противоиона анионообменного носителя в подвижной фазе, $[H^+]_m$ — концентрация ионов водорода в подвижной фазе, K_1 — константа ионообменного равновесия, K_2 — константа образования NH .

Из уравнений (3) и (4) следует, что коэффициент емкости зависит от природы фиксированных ионогенных групп, ионообменной емкости, природы матрицы ионообменника, типа и концентрации анионов в элюенте, величины рН элюента и температуры, при которой проводится разделение анионов.

На рис. 11.6—11.8 представлены хроматограммы, полученные при разделении конъюгатов эстрогенов на колонках с различными типами ионообменных целлюлоз.

Таблица 11.4. Влияние типа ионообменной целлюлозы (см. табл. 11.3) на коэффициент емкости конъюгатов эстрогенов [33]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); элюент: перхлорат+0,01 М фосфат (рН 6,8); обнаружение: по поглощению при 220 нм

ЕСТЕОЛА-целлюлоза (0,025 моль/л ClO ₄ ⁻ , 70 °С)		Целлекс PEI (0,100 моль/л ClO ₄ ⁻ , 50 °С)		Целлекс AE (0,025 моль/л ClO ₄ ⁻ , 70 °С)		Целлекс Т (0,100 моль/л ClO ₄ ⁻ , 70 °С)		Целлекс GE (0,25 моль/л ClO ₄ ⁻ , 75 °С)	
Конъюгат стероида	k	Конъюгат стероида	k	Конъюгат стероида	k	Конъюгат стероида	k	Конъюгат стероида	k
β-D-Глюкуронид тестостерона	0,54	3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,42	β-D-Глюкуронид тестостерона	0,55	β-D-Глюкуронид тестостерона	0,82	3-β-D-Глюкуронид эстриола	1,75
3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,76	β-D-Глюкуронид тестостерона	0,46	3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,73	3-β-D-Глюкуронид эстриола	1,01	β-D-Глюкуронид тестостерона	1,59
β-D-Глюкуронид эстрона	1,03	17-β-D-Глюкуронид эстриола	1,03	β-D-Глюкуронид эстрона	0,75	β-D-Глюкуронид эстрона	1,49	β-D-Глюкуронид эстрона	2,09
3-Фосфат эстрона	1,24	16-β-D-Глюкуронид эстриола	1,16	Сульфат тестостерона	0,90	3-β-D-Глюкуронид эстриола-17β	1,76	17-β-D-Глюкуронид эстриола	2,40
Сульфат тестостерона	1,57	β-D-Глюкуронид эстрона	1,18	3-β-D-Глюкуронид эстриола-17β	1,05	3-Фосфат эстрона	1,94	Сульфат тестостерона	2,48
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,59	3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,34	3-Сульфат эстриола	1,45	17-β-D-Глюкуронид эстриола	2,05	3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	2,60
3-Фосфат эстрадиола-17β	1,86	3-Сульфат эстриола	1,42	3-Сульфат эстрона	1,49	3,17-β-D-Диглюкуронид эстрадиола-17β	2,16	16-β-D-Глюкуронид эстриола	2,69
17-β-D-Глюкуронид эстриола	1,98	Сульфат тестостерона	1,69	17-β-D-Глюкуронид эстриола	1,63	16-β-D-Глюкуронид эстриола	2,17	3-Сульфат эстриола	3,09
16-β-D-Глюкуронид эстриола	2,14	17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,75	17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,72	3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	2,31	17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	3,43
3,17-β-D-Диглюкуронид эстрадиола-17β	2,39	3,17-β-D-Диглюкуронид эстрадиола-17β	1,85	3-Сульфат эстрадиола-17α	1,80	3-Фосфат эстрадиола-17β	2,32	3-Сульфат эстрона	3,92
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	2,68	3-Сульфат эстрона	4,65	16-β-D-Глюкуронид эстриола	1,82	Сульфат тестостерона	2,37	3-Сульфат эстрадиола-17α	4,20

3-Сульфат эстро- ла	3,13	3-Сульфат эквили- на	4,85	3-Сульфат эквилн- на	1,90	17-β-D-Глюкуро- нид эстрадиола- 17β	2,56	3-Сульфат эквили- на	4,50
17-Фосфат эстра- диола-17β	3,27	3-Сульфат эстра- диола-17α	4,97	3-Сульфат эстра- диола-17β	2,08	17-Фосфат эстра- диола-17β	3,07	3-Сульфат эстра- диола-17β	4,94
3-Сульфат эстрола	3,99	3-Сульфат-17-β-D- глюкуронид эстрадиола-17β	4,97	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквилина	2,49	3-Сульфат эстрио- ла	3,84	3,17-β-D-Диглюку- ронид эстрадно- ла-17β	5,01
3-Сульфат эквили- на	5,13	Сульфат эстрадио- ла-17β	5,26	3,17-β-D-Диглюко- ронид эстрадио- ла-17β	2,74	3-Сульфат эстрола	5,64	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквилина	5,32
3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	5,20	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквилина	5,65	3-Сульфат эквиле- нина	2,94	3-Сульфат эстра- диола-17α	6,02	17-Сульфат эстра- диола-17β	5,70
3-Сульфат эстра- диола-17α	5,53	17-Сульфат эстра- диола-17β	6,04	17-Сульфат эстра- диола-17β	3,04	3-Сульфат эстра- диола-17β	6,77	3-Сульфат эквиле- нина	6,91
3-Сульфат эстра- диола-17β	6,06	3,17-Дисульфат эстриола	6,70	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквиленна	3,56	3-Сульфат эквили- на	6,82	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквиленина	7,88
3-Сульфат 17α-ди- гидроэквилина	6,98	17-Фосфат эстра- диола-17β	6,74	3-Сульфат 17-β-D- глюкуронид эст- радиола-17β	4,97	17-Сульфат эстра- диола-17β	7,38	3-Сульфат-17-β-D- глюкуронид эстра- диола-17β	9,17
17-Сульфат эстра- диола-17β	7,04	3-Фосфат эстрола	7,95	17-Фосфат эстра- диола-17β	5,25	3-Сульфат 17-β-D- глюкуронид эст- радиола-17β	7,47	3,17-Дисульфат эстрвола	9,86
3-Сульфат-17-β-D- глюкуронид эст- радиола-17β	7,09	3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	9,04	3-Фосфат эстрола	6,46	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквилина	7,78	3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	13,50
3-Сульфат эквиле- нина	9,04	3-Фосфат эстра- диола-17β	9,17	3,17-Дисульфат эстриола	6,97	3-Сульфат эквиле- нина	12,40	16,17-Дисульфат эстриола	14,10
3,17-Дисульфат эстриола	10,90	3-Сульфат эквиле- нина	9,23	3,17-Дифосфат эст- радиола-17β	8,51	3,17-Дисульфат эстриола-17β	13,75	3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	14,35
3-Сульфат 17α-ди- гидроэквиленина	13,25	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквиленина	10,75	3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	8,51	3-Сульфат 17α-ди- гидроэквиленина	13,90	3-Фосфат эстрола	16,00
16,17-Дисульфат эстриола	16,30	3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	12,90	3-Фосфат эстра- диола-17β	8,71	16,17-Дисульфат эстриола	18,10	3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	19,20
3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	16,80	16,17-Дисульфат эстриола	16,15	16,17-Дисульфат эстрола	13,00	3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	20,65	3-Фосфат эстра- диола-17β	19,60

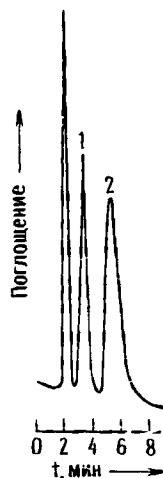
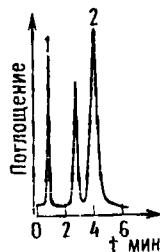
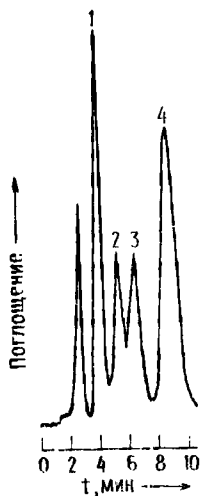


Рис. 11.6. Разделение конъюгатов эстрогена [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: целлюкс Т (14 мкм); элюент: 0,25 моль/л перхлората + 0,01 моль/л фосфата, рН 6,8; обнаружение: при 220 нм; температура: 75 °С. 1 — β-D-глюкуронид тестостерона; 2 — β-D-глюкуронид эстрона; 3 — 3-сульфат эстриола; 4 — 3-сульфат эстрона.

Рис. 11.7. Разделение 3-сульфата эстрадиола-17α (1) и 17-сульфата эстрадиола-17β (2) [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); подвижная фаза: целлюкс АЕ (14 мкм); элюент: 0,025 моль/л перхлората + 0,01 моль/л фосфата, рН 6,8; обнаружение: при 220 нм; температура: 70 °С.

Рис. 11.8. Разделение 3-сульфата эстриола (1) и 3-сульфата эстрона (2) [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: целлюкс РЕ1 (11 мкм); элюент: 0,25 моль/л перхлората + 0,01 моль/л фосфата, рН 8,5; обнаружение: при 220 нм; температура: 50 °С.

В табл. 11.4 показано влияние некоторых типов целлюлозных ионообменников на коэффициент емкости. Исходя из приведенных в таблице данных, можно сделать следующие выводы.

При разделении конъюгатов эстрогенов соединение, использованное для получения конъюгата, играет большую роль, чем сам стероид.

Конъюгаты по кольцу А элюируются раньше конъюгатов по кольцу D.

Зависимость порядка элюирования от типа стероида иллюстрирует следующий ряд: эстриол, эстрон, эквилин, эстрадиол, эквилинин.

Сульфаты имеют самый большой коэффициент емкости; глюкурониды обычно элюируются раньше фосфатов.

Средний размер частиц $\bar{d}_p$ целлюлозного ионообменника оказывает относительно малое влияние на коэффициент емкости, тогда как изменение ионообменных свойств целлюлозы сказывается весьма ощутимо.

Таблица 11.5. Зависимость коэффициента емкости k от типа и размера частиц ЕСТЕОЛА-целлюлозы [33]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); элюент: 0,025 М перхлорат+0,0125 М фосфат (рН 7,0); обнаружение: по поглощению при 220 нм; температура: 70 °С

Конъюгат стероида	ЕТ 41 ($\overline{dp}$ = = 11 мкм)	Целлекс Е ($\overline{dp}$ = = 11 мкм)	В 300 ($\overline{dp}$ = = 11 мкм)	В 300 ($\overline{dp}$ = = 13 мкм)	В 300 ($\overline{dp}$ = = 19 мкм)
β-D-Глюкуронид тестостерона	1,58	1,09	0,47	0,41	0,45
β-D-Глюкуронид эстриола	2,46	1,71	0,67	0,51	0,67
β-D-Глюкуронид эстрона	3,20	2,43	0,92	0,65	0,84
3-Фосфат эстрона	3,90	4,44	1,00	0,85	0,88
3,17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	10,00	4,15	1,33	1,13	1,24
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	4,38	3,71	1,42	1,05	1,30
Сульфат тестостерона	4,80	4,50	1,49	1,04	1,27
17-β-D-Диглюкуронид эстриола	5,07	4,65	1,74	1,28	1,68
3-Фосфат эстрадиола-17β	4,76	6,44	1,47	1,27	1,32
16-β-D-Глюкуронид эстриола	5,30	4,86	1,86	1,38	1,80
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	6,49	6,29	2,44	1,74	2,24
3-Сульфат эстриола	9,90	8,62	2,89	1,77	2,56
3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	11,70	10,00	2,40	2,15	2,32
17-Фосфат эстрадиола-17β	13,95	14,90	2,86	2,23	2,77
3-Сульфат эстрона	12,60	12,15	3,81	2,14	3,11
3-Сульфат эстрадиола-17β	17,10	18,45	5,87	3,48	4,91
17-Сульфат эстрадиола-17β	20,80	22,65	6,81	3,99	5,75
3,17-Дисульфат эстриола	66,50	42,50	9,55	5,55	7,91
3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	—	66,60	15,80	8,65	12,70

Согласно уравнениям (1) — (4), коэффициент емкости зависит от концентрации анионов $[A^-]$ в элюенте. Из кривой зависимости k от величины обратной концентрации аниона, полученной для различных конъюгатов эстрогенов, следует, что селективность меняется весьма существенно и что даже возможно изменение порядка элюирования на обратный; глюкурониды обычно элюируются первыми, вслед за ними элюируются фосфаты, а затем сульфаты; при высоких значениях ионной силы элюента моноконъюгаты имеют большую подвижность, чем ди-конъюгаты; при высокой концентрации анионов порядок выхода конъюгатов с колонки может смениться на обратный (рис. 11.9).

Хотя концентрация противоионов сильно влияет на время удерживания различных конъюгатов эстрогенов, это влияние сказывается только на абсолютном значении коэффициента ем-

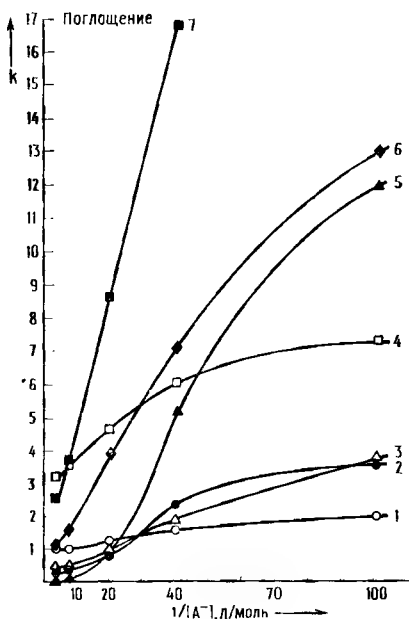


Рис. 11.9. Зависимость коэффициента емкости k для конъюгатов 17 β -эстрадиола от обратной концентрации анионов $1/[A^-]$ в элюенте [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза ЕСТЕОЛА-целлюлоза В 300 (19 мкм); элюат: перхлорат+0,01 моль/л фосфата, рН 6,8; обнаружение: при 220 нм; температура: 70 °С.

1 — 3 β -D-глюкуронид эстрадиола-17 β ; 2 — 3,17- β -D-диглюкуронид эстрадиола-17 β ; 3 — 3-фосфат эстрадиола-17 β ; 4 — 3-сульфат эстрадиола-17 β ; 5 — 3,17-дифосфат эстрадиола-17 β ; 6 — 3-сульфат-17- β -D-глюкуронид эстрадиола-17 β ; 7 — 3,17-дисульфат эстрадиола-17 β .

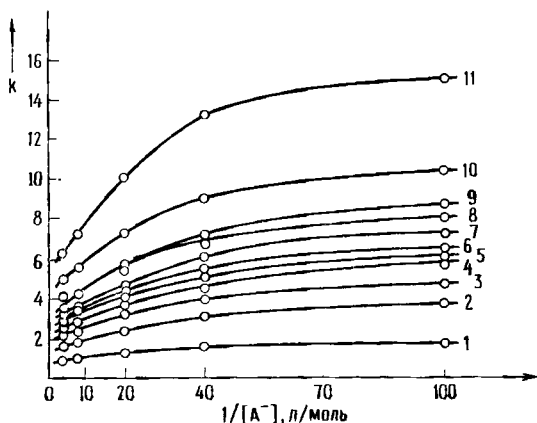


Рис. 11.10. Зависимость коэффициента емкости k для сульфатов эстрогенов от обратной концентрации анионов $1/[A^-]$ в элюенте [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ЕСТЕОЛА-целлюлоза В 300 (19 мкм); элюент: перхлорат+0,01 моль/л фосфата (рН 6,8); обнаружение: при 220 нм; температура: 70 °С.

1 — сульфат тестостерона; 2 — 3-сульфат эстриола; 3 — 3-сульфат эстрона; 4 — 17-сульфат эстриола; 5 — 3-сульфат эквилина; 6 — 3-сульфат эстрадиола-17 α ; 7 — 3-сульфат эстрадиола-17 β ; 8 — 3-сульфат 17 α -дигидроэквилина; 9 — 17-сульфат эстрадиола-17 β ; 10 — 3-сульфат эквилинина; 11 — 3-сульфат 17 α -дигидроэквилинина.

кости и не оказывает воздействия на порядок их элюирования, что наглядно подтверждает кривая зависимости коэффициентов емкости от обратной концентрации анионов $[A^-]^{-1}$ в элюенте для различных конъюгатов эстрогенов (рис. 11.10).

Коэффициенты емкости конъюгатов эстрогенов, полученные при их разделении на целлюлозных ионообменниках, зависят от природы анионов и катионов элюента, однако наблюдаемые изменения селективности невелики. Малые коэффициенты емкости наблюдаются при разделении фосфатов эстрогенов с использованием ионов магния в качестве катионов элюента, что указывает на образование комплексов (табл. 11.6).

Рис. 11.11 показывает, как влияет величина рН элюента на коэффициенты емкости конъюгатов эстрогенов при их разделении на целлюлозных ионообменниках. Из приведенных данных можно сделать следующие выводы.

Конъюгаты эстрогенов элюируются в следующем порядке: глюкурониды, фосфаты, сульфаты. При низких рН наблюдается более сильное удерживание. Одинаковые конъюгаты элюируются в следующем порядке: эстриол, эстрон, эстрадиол.

В принципе коэффициенты емкости конъюгатов эстрогенов при разделении на колонках с целлюлозными ионообменниками уменьшаются с увеличением температуры. Однако величина уменьшения колеблется от соединения к соединению, как это показано на рис. 11.12 на примере сульфатов некоторых эстрогенов.

Авторы работы [37] провели разделение конъюгатов эстрогенов на сильном анионообменнике — тонкодисперсном силикагеле с химически привитыми ионами четвертичного аммония (лихросорб AN, 10 мкм). Коэффициенты емкости конъюгатов эстрогенов, полученные при их разделении на колонке с лихросорбом AN с использованием различных подвижных фаз, указаны в табл. 11.7. Как следует из приведенных в этой таблице данных, с уменьшением концентрации метанола и увеличением рН элюента возрастает селективность в ряду конъюгатов одного типа. При высоких рН элюента происходят изменения в неподвижной фазе, лихросорбе AN, и наблюдается размывание пиков. По сравнению с обращенно-фазовой хроматографией может значительно увеличиваться дисперсия пиков.

Анионообменники с углеводородной матрицей — отличная неподвижная фаза для разделения углеводов [38], кроме того, они также пригодны и для разделения конъюгатов эстрогенов (табл. 11.8).

Тем не менее разделение конъюгатов эстрогенов на колонке с аминоксом А-28 требует больших затрат времени (рис. 11.13) [37]. При разделении конъюгатов эстрогенов на анионообменниках с развитой поверхностью (зипакс SAX) и поверхностно-пористых анионообменниках (AL пеллионекс WAX) эффектив-

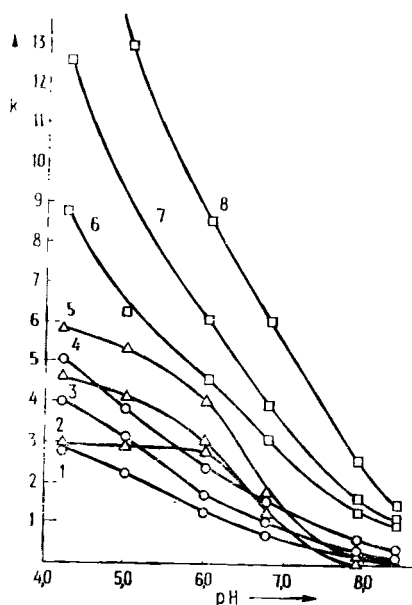


Рис. 11.11. Влияние величины pH элюента на коэффициент емкости k для конъюгатов эстрогенов [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ЕСТЕОЛА-целлюлоза В 300 (19 мкм); элюент: 0,025 моль/л перхлората + 0,01 моль/л фосфата; обнаружение: при 220 нм; температура: 70 °С; 1 — 3-β-D-глюкуронид эстриола; 2 — 3-фосфат эстриола; 3 — β-D-глюкуронид эстрона; 4 — 3-фосфат эстрона; 5 — 3-β-D-глюкуронид эстрадиола-17β; 6 — 3-фосфат эстрадиола-17β; 7 — 3-сульфат эстриола; 8 — 3-сульфат эстрона; 9 — 3-сульфат эстрадиола-17β.

ность колонки значительно ниже, следовательно, эти материалы менее приемлемы в качестве неподвижной фазы [37].

Фундаментальные исследования по разделению конъюгатов эстрогенов на колонках с неполярными химически связанными неподвижными фазами на основе силикагеля проведены ван дер Валом и Губером [37]. В табл. 11.9 обобщены результаты их исследований зависимости коэффициентов емкости конъюгатов эстрогенов от величины pH, концентрации солей и присутствия кислот и оснований в метанольных буферных подвижных фазах.

Данные, приведенные в табл. 11.10 и на рис. 11.14, показывают, что влияние природы органического модификатора на

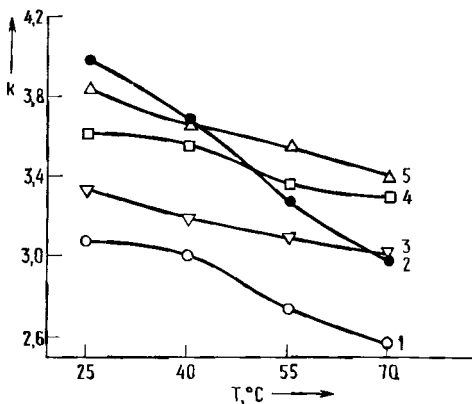


Рис. 11.12. Зависимость коэффициента емкости k от температуры для некоторых сульфатов эстрогенов [33].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ЕСТЕОЛА-целлюлоза ET 41 (11 мкм); элюент: 0,25 моль/л перхлората + 0,01 моль/л фосфата, pH 8,5; обнаружение: при 220 нм. 1 — 17-сульфат эстриола; 2 — 3-сульфат эквилина; 3 — 3-сульфат эстрадиола-17α; 4 — 3,17-дисульфат эстрадиола-17β; 5 — 3-сульфат эстрадиола-17β.

Таблица 11.6. Влияние различных катионов и анионов, содержащихся в элюенте, на коэффициент смкости k конъюгатов эстрогенов [33]
 Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ЕСТЕОЛА-целлюлоза В 300 (19 мкм); элюент: 0,01 М фосфат (рН 6,8); обнаружение: по поглощению при 220 нм; температура: 70 °С

Конъюгат стероида [ClO ₄ ⁻]	Элюент											
	NaClO ₄ 0,025	NaHSO ₄ 0,100	NaNO ₃ 0,100	NaCl 0,100	KCl 0,100	NH ₄ Cl 0,100	MgCl ₂ 0,050	NH ₄ фосфат 0,500	Na цитрат 0,005	Na формат 0,100	Na ацетат 0,100	Na пропионат 0,125
β-D-Глюкуронид тестостерона	0,54	0,41	0,29	0,35	0,36	0,36	0,37	1,12	0,42	0,37	0,42	0,36
3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,76	0,63	0,50	0,58	0,62	0,60	0,63	1,27	0,68	0,61	0,68	0,58
β-D-Глюкуронид эстрона	1,03	0,74	0,59	0,67	0,71	0,69	0,72	1,72	0,74	0,68	0,77	0,67
Сульфат тестостерона	1,57	1,17	0,94	1,03	1,08	1,07	1,25	3,01	1,07	1,07	1,14	1,01
3-Фосфат эстроиа	1,24	0,67	0,64	0,75	0,84	0,79	0,49	0,93	1,34	0,87	1,04	0,77
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,59	1,22	0,98	1,09	1,16	1,11	1,19	2,56	1,17	1,14	1,20	1,09
3,17-β-D-Диглюкуронид эстрадиола-17β	2,39	1,04	0,88	1,19	1,28	1,30	1,53	1,47	1,81	1,36	1,62	1,18
3-Фосфат эстрадиола-17β	1,86	1,08	1,02	1,19	1,31	1,21	0,78	1,33	1,97	1,35	1,61	1,21
3,17-Дифосфат эстрадиола-17β	5,20	1,28	1,55	1,18	1,31	1,21	0,76	0,59	1,97	2,76	3,62	2,14
17-β-D-Глюкуронид эстриола	1,98	1,69	1,30	1,43	1,50	1,47	1,52	3,15	1,60	1,54	1,60	1,52
16-β-D-Глюкуронид эстриола	2,14	1,78	1,42	1,55	1,61	1,51	1,54	3,38	1,72	1,59	1,71	1,56
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	2,68	2,18	1,75	1,92	2,05	1,95	2,03	4,05	2,11	2,02	2,17	1,89
3-Сульфат эстриола	3,13	2,53	2,04	2,26	2,31	2,29	2,74	5,03	2,34	2,25	2,53	2,27
17-Фосфат эстрадиола-17β	3,27	2,52	2,06	2,34	2,50	2,26	2,04	3,35	2,82	2,47	2,68	2,30
3-Сульфат эстроиа	3,99	2,84	2,37	2,56	2,73	2,62	3,15	6,45	2,50	2,52	2,73	2,43
3-Сульфат эквилина	5,13	3,67	3,05	3,32	3,51	3,34	3,97	8,43	3,24	3,23	3,52	3,12
3-Сульфат эстрадиола-17α	5,53	4,32	3,45	3,83	4,04	3,83	4,54	9,80	3,54	3,75	3,92	3,48
3-Сульфат эстрадиола-17β	6,06	4,72	3,76	4,20	4,47	4,20	5,00	10,60	3,94	4,16	4,42	3,94
3-Сульфат 17α-дигидроэквилина	6,98	5,40	4,50	5,03	5,15	4,95	5,83	12,00	4,69	4,74	5,23	4,54
3-Сульфат-17-β-D-глюкуронид эстрадиола-17β	7,09	4,08	3,50	4,80	5,34	4,96	6,76	6,29	5,57	4,95	5,98	4,42
17-Сульфат эстрадиола-17β	7,04	5,72	4,53	5,07	5,34	4,91	5,72	11,95	4,95	4,93	5,36	4,68
3-Сульфат эквилинина	9,04	6,58	5,41	5,86	6,22	5,91	7,07	13,80	5,54	5,86	6,17	5,53
3,17-Дисульфат эстриола	10,90	7,32	6,02	8,34	9,22	8,94	13,50	10,90	9,17	8,10	9,88	7,31
3-Сульфат 17α-дигидроэквилинина	13,25	9,87	8,22	9,10	9,58	9,05	10,85	20,50	8,25	8,86	9,30	8,09
16,17-Дисульфат эстриола	16,30	10,10	9,17	11,70	12,60	12,70	18,0	11,20	14,60	12,30	14,30	10,40
3,17-Дисульфат эстрадиола-17β	16,80	11,60	9,44	13,00	14,80	14,10	20,40	19,60	13,60	12,70	15,70	10,60

Таблица 11.7. Коэффициенты емкости конъюгатов эстрогенов [37]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: лихросорб АН (10 мкм); обнаружение: по поглощению при 220 нм; элюент: А — 25% пропанола-1+75% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 60 °С; Б — 50% этанола+50% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 70 °С; В — 70% этанола+30% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 70 °С; Г — 80% метанола+20% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 70 °С; Д — 80% метанола+20% 0,01 М фосфата (рН 6,0), 70 °С; Е — 60% метанола+40% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 60 °С; Ж — 60% метанола+40% (1,0 М NaClO₄+0,01 М фосфат, рН 9,0), 70 °С; З — 60% метанола+40% (0,01 М фосфат (рН 9,0), 0,2%-ный пропиламин), 70 °С; И — 71% метанола+9% ацетонитрила+20% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 60 °С; К — 60% метанола+20% ацетонитрила+20% 0,01 М фосфата (рН 9,0), 60 °С; Л — 60% метанола+20% ацетонитрила+20% 0,01 М фосфата (рН 6,0), 70 °С; М — 60% метанола+20% ацетонитрила+20% 0,01 М фосфата (рН 3,0), 70 °С; Н — 48% метанола+24% ацетонитрила+24% 0,01 М фосфата (рН 3,0), 70 °С

Соединение	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Н
β-D-Глюкуронид тестостерона	1,86	0,92	0,66	0,71	2,2	1,20	0,71	0,75	0,74	0,40	1,57	1,70	1,6
3-β-D-Глюкуронид эстриола	1,31	0,92	0,96	0,99	2,7	1,02	0,11	0,66	1,04	0,53	2,0	2,4	2,7
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	3,3	1,55	1,09	1,31	3,1	2,4	0,28	1,35	1,24	0,72	2,2	2,0	1,8
Сульфат тестостерона	5,8	2,1	1,12	1,22	3,3	2,5	0,30	1,55	1,42	0,63	2,0	12,7	8,0
3-Сульфат эстриола	6,8	2,8	1,89	1,88	4,3	3,1	0,24	1,75	1,66	0,88	2,5	15,5	9,0
3-Сульфат 17α-дигидроэквиленина	14,4	5,0	2,2	2,7	5,9	7,4	0,47	3,6	2,5	1,17	3,1	18,3	10,2
3,17-β-D-Диглюкуронид эстрадиола 17β	4,7	4,6	4,8	6,4	3,2	4,9	0,15	2,9	6,8	2,9	—	22,7	20,3
17-Фосфат эстрадиола-17β	16,8	8,4	7,3	7,6	5,8	10,4	0,56	3,3	4,7	3,5	4,4	14,4	16,2
3-Фосфат 17β-эстрадиола	12,5	10,2	9,9	13,0	31,8	9,1	0,48	4,6	12,7	6,0	21,3	20,3	17,1
3-Фосфат эстрола	13,3	10,2	11,3	13,6	33,6	10,0	0,54	4,7	12,7	5,8	21,7	19,6	15,6

Таблица 11.8. Коэффициенты емкости глюкуронидов эстрогенов при разделении на поверхностно-пористых и полистирольных анионообменниках [37]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зипакс SAX (А-Г), пеллюнекс WAX (Д-З) и аминекс А-28 (И-О); элюент: А — 3,0 М ацетат (рН 4,0), 20 °С, Б — 2,0 М ацетат (рН 4,0), 20 °С, В — 2,0 М ацетат (рН 4,0), 40 °С, Г — 2,0 М ацетат (рН 4,0), 60 °С, Д — 0,005 М перхлорат+0,0002 М фосфат (рН 4,0), 20 °С, Е — 0,01 М перхлорат+0,0002 М фосфат (рН 4,0), 20 °С, Ж — 0,01 М перхлорат+0,0002 М фосфат (рН 4,0), 40 °С, З — 0,01 М перхлорат+0,0002 М фосфат (рН 4,0), 60 °С, И — 0,1 М ацетат (рН 4,0), 20 °С, К — 6,0 М ацетат (рН 4,0), 70 °С, Л — 8,3 М ацетат (рН 4,0), 70 °С, М — 8,3 М ацетат (рН 4,0), 90 °С, Н — 8,3 М ацетат (рН 5,1), 90 °С, О — 10,1 М ацетат (рН 4,0), 90 °С

Соединение	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М	Н	О
β-D-Глюкуронид тестостерона	0,00	1,09	0,94	0,60	1,37	0,78	0,77	0,76	0,86	4,8	1,61	1,51	1,75	0,65
3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,00	0,17	0,17	0,13	2,3	1,26	1,14	0,92	1,99	6,4	2,5	2,3	2,5	1,11
17-β-D-Глюкуронид эстриола	0,26	1,57	1,15	0,76	3,5	—	1,72	1,47	—	—	7,0	5,9	6,2	2,8
16-β-D-Глюкуронид эстриола	0,26	1,67	1,20	0,80	3,9	2,0	1,81	1,56	4,2	—	7,5	6,1	6,6	2,9
β-D-Глюкуронид эстрона	0,29	2,4	1,45	1,02	6,4	3,6	2,6	1,95	2,2	—	4,9	4,1	4,9	2,0
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	0,42	2,7	1,79	1,20	5,5	2,9	2,6	1,84	4,1	—	7,2	6,1	7,3	2,9
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	1,00	6,3	3,7	2,2	6,0	3,6	2,8	2,4	9,1	—	14,3	11,0	14,1	5,3

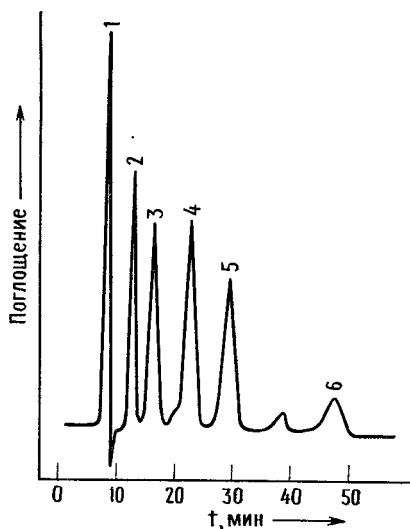


Рис. 11.13. Хроматограмма глюко-нидов эстрогенов [37].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); не-подвижная фаза: аминекс А-28 (8—12 мкм); элюент: 10,1 М ацетат, рН 4,0; обнару-жение: при 275 нм; температура: 90 °С; дав-ление: 90 бар.

1 — цитозин; 2 — β-D-глюкуронид тестос-терона; 3 — 3-β-D-глюкуронид эстриола; 4 — β-D-глюкуронид эстрона; 5 — 3-β-D-глюку-ронид эстрадиола-17β; 6 — 17-β-D-глюку-ронид эстрадиола-17β.

Таблица 11.9. Зависимость коэффициентов емкости конъюгатов эстрогенов от состава метанольной буферной подвижной фазы [37]

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: лихросорб RP8 (5 мкм); обна-ружение: по поглощению при 220 или 275 нм; температура: 25 °С; элюент: А — 40% ме-танола + 60% 0,08 М фосфата (рН 4,5), Б — 40% метанола + 60% 0,05 М фосфата (рН 7,7), В — 40% метанола + 60% (0,05 М фосфата (рН 7,7) + 0,5 М NaClO₄), Г — 40% метанола + + 60% (0,07 М фосфата (рН 4,5) + 0,1 М триметиламина), Д — 40% метанола + 60% (0,07 М фосфата (рН 4,5) + 0,1 М триметиламина + 0,05 М пентансульфоновой кислоты), Е — 40% метанола + 60% (0,07 М фосфата (рН 4,5) + 0,05 М пентансульфоновой кислоты)

Соединения	А	Б	В	Г	Д	Е
3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,75	0,45	0,45	0,55	0,25	0,2
17-β-D-Глюкуронид эстриола	4,5	2,6	2,8	3,4	1,9	1,5
16-β-D-Глюкуронид эстриола	4,6	2,8	2,9	3,7	1,9	1,55
β-D-Глюкуронид эстрона	6,4	3,8	3,7	5,1	2,8	2,2
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	8,2	4,6	4,6	6,1	3,5	2,7
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	11,8	6,2	6,5	8,6	4,6	3,7
β-D-Глюкуронид тестостерона	16,5	8,2	7,4	11,2	6,2	4,8
3-Сульфат эстриола	1,8	1,2	1,2	1,7	0,7	0,55
17-Сульфат эстриола	6,2	3,9	3,9	5,2	2,6	2,0
3-Сульфат эквиленина	9,5	5,5	5,2	7,5	3,8	2,9
3-Сульфат 17α-дигидроэквиленина	10,5	6,2	6,1	8,4	4,4	3,4
3-Сульфат эквиленина	11,5	6,8	6,3	9,3	4,7	3,5
3-Сульфат эстрона	13,1	7,7	7,2	10,3	5,4	4,0
3-Сульфат 17α-дигидроэквилина	13,1	7,7	7,9	10,5	5,7	4,3
3-Сульфат эстрадиола-17β	15,1	9,1	8,9	12,3	6,5	4,8
17-Сульфат эстрадиола-17β	16,6	10,0	10,5	13,6	7,3	5,3
3-Сульфат эстрадиола-17α	17,2	10,2	10,0	13,8	7,2	5,3
Сульфат тестостерона	22,8	13,3	12,0	18,0	9,5	6,7

Таблица 11.10. Зависимость коэффициентов емкости конъюгатов эстрогенов от органических модификаторов подвижной фазы и температуры колонки [37]

Колонка: 250×3 мм; обнаружение: по поглощению при 220 или 275 нм; неподвижная фаза: А—К—лихросорб РР2 (5 мкм), Л—лихросорб РР8 (5 мкм); элюент: А—30% метанола+70% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, Б—20% этанола+80% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, В—12% пропанола+88% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, Г—7% н-бутанола+93% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, Д—15% ацетонитрила+85% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, Е—2% дихлорметана+28% метанола+70% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 25 °С, Ж—7% н-бутанола+93% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 70 °С, З—15% ацетонитрила+85% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 70 °С, И—2% дихлорметана+28% метанола+70% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 70 °С, К—2% хлороформа+35% метанола+63% 0,05 М фосфата (рН 8,0), 70 °С, Л—20% метанола+20% ацетонитрила+60% 0,05 М фосфата (рН 5,0)

Соединение	А	Б	В	Г	Д	Е	Ж	З	И	К	Л		
											25 °С	50 °С	75 °С
3-β-D-Глюкуронид эстриола	0,8	0,7	0,7	1,0	0,6	0,6	0,4	0,55	0,5	0,1	0,17	0,14	0,13
17-β-D-Глюкуронид эстриола	3,0	3,5	3,4	4,3	2,7	2,7	1,8	2,4	1,8	0,7	1,28	1,12	0,86
16-β-D-Глюкуронид эстриола	3,0	3,6	3,5	4,3	2,7	2,7	1,8	2,4	1,8	0,7	1,28	1,12	0,86
β-D-Глюкуронид эстрона	4,0	5,2	5,6	6,1	4,5	11,9	2,0	4,2	5,2	3,3	3,0	2,7	2,0
3-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	4,5	5,7	6,4	8,2	3,5	5,3	2,8	3,4	4,5	1,5	2,1	1,89	1,47
17-β-D-Глюкуронид эстрадиола-17β	6,6	7,9	8,1	10,6	5,0	7,0	3,7	4,4	4,75	1,5	2,5	2,2	1,61
β-D-Глюкуронид тестостерона	9,0	10,4	9,5	7,9	6,8	16,7	2,6	6,1	8,1	4,2	4,0	3,5	2,7
3-Сульфат эстриола	2,3	2,6	2,2	2,3	2,5	2,0	1,2	2,1	1,25	0,4	1,32	1,14	0,90
17-Сульфат эстриола	5,8	6,9	6,0	7,3	6,3	5,8	3,4	5,0	3,1	1,1	—	3,2	2,4
3-Сульфат эквilenина	9,4	12,0	10,7	11,9	16,9	19,2	4,5	11,9	8,1	5,1			
3-Сульфат 17α-дигидроэквilenина	9,5	12,5	12,1	14,9	13,1	12,0	6,2	9,9	5,8	2,4			
3-Сульфат эквilenина	10,7	13,7	12,1	12,3	18,3	20,6	4,7	12,6	9,7	5,5			
3-Сульфат эстроиа	11,8	15,4	13,5	15,5	21,4	38	5,5	15,2	12,5	7,2			
3-Сульфат эстрадиола-17β	12,4	16,9	15,5	18,3	16,6	16,1	8,0	12,0	8,1	3,3			
17-Сульфат эстрадиола-17β	13,7	18,6	17,3	19,9	15,6	15,7	8,9	10,8	7,6	2,2			
3-Сульфат эстрадиола-17α	14,7	20,2	18,6	21,6	18,0	25,3	9,4	13,7	9,9	3,85			

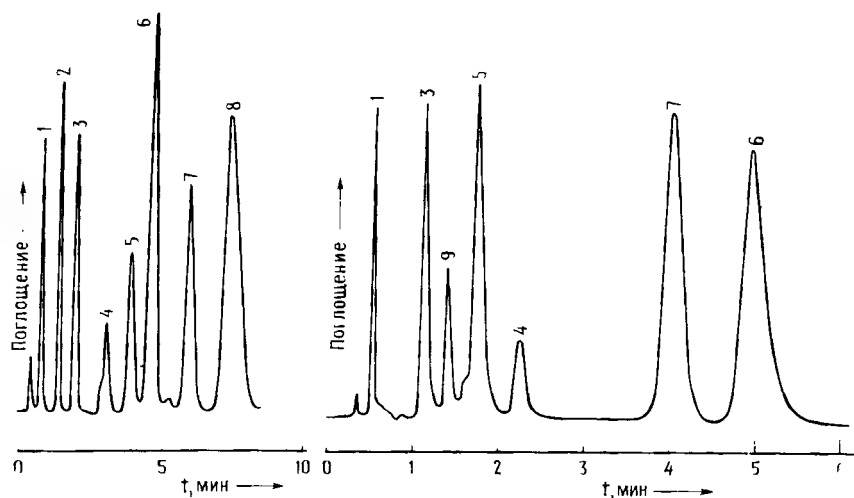


Рис. 11.14. Хроматограммы конъюгатов эстрогенов, полученные в присутствии различных модификаторов подвижной фазы [37].

Колонка: 150×3 мм (внутр. диаметр); температура: 70 °С; неподвижная фаза: лихросорб RP-2 (5 мкм); элюент: 7% бутанола+93% 0,05 М фосфата, pH 8,0 (а) и 15% ацетонитрила+85% 0,05 М фосфата, pH 8,0 (б); обнаружение: при 229 нм.

1 — 3-β-D-глюкуронид эстриола; 2 — 3-сульфат эстриола; 3 — 17-β-D-глюкуронид эстриола; 4 — β-D-глюкуронид тестостерона; 5 — 17-β-D-глюкуронид эстрадиола-17β; 6 — 3-сульфат эквilenна; 7 — 3-сульфат 17α-дигидроэквиленна; 8 — 3-сульфат эстрона; 9 — 3-β-D-глюкуронид эстрадиола-17β.

коэффициенты селективности конъюгатов эстрогенов при разделении на колонках с неполярными, химически связанными неподвижными фазами на основе силикагеля может быть весьма значительным.

11.4. Прогестины

К прогестинам относятся C_{21} -стероидные гормоны, которые вырабатываются как в коре надпочечников (adrenal cortex) мужских и женских особей млекопитающих, так и в желтом теле (corpus luteum) во время менструального цикла. На рис. 11.15 приведены структурные формулы некоторых прогестинов.

Используя адсорбционную и обращенно-фазовую ВЭЖХ в различных сочетаниях, можно проводить разделение любых, в том числе и весьма сложных смесей прогестерона и его производных [39]. В табл. 11.11 указано время удерживания производных прогестерона, разделенных методами адсорбционной и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Основываясь на данных табл. 11.11, можно сделать следующие выводы:

а. Более полярные 5β-прегнан-3,20-дион и прегнан-5-ен-3,20-дион можно отделить от менее полярного (относительно проге-

Таблица 11.11. Время удерживания производных прогестерона при разделении методом ВЭЖХ [39]

Колонка: А, Б — 600×2 мм (внутр. диаметр), В — 500×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: А, Б — партиял 5 (5 мкм), В — зорбакс ВР-ОДС (7–8 мкм); элюент: А — 0,25% этанола в дихлорметане, Б — гексан/изопропанол (97:3), В — ацетонитрил/вода (6:4); объемная скорость: 1 мл/мин; обнаружение: А — по поглощению при 280 нм, Б, В — рефрактометрическое; проба: А, Б — от 17 до 135 мкг каждого стероида в дихлорметане (А) или в элюенте (Б), В — 85 мкг каждого стероида в элюенте

Соединение	t_R , мин		
	А	Б	В
Дионы			
Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)	44	—	40
Прегн-5-ен-3,20-дион	51	—	52
5 α -Прегнан-3,20-дион	18	—	62
5 β -Прегнан-3,20-дион	22	—	51
Моногидроксикетоны			
3 β -Гидроксипрегн-5-ен-20-дион (прегненолон)	37	—	36
20 α -Гидроксипрегн-4-ен-3-он	—	18	25
20 β -Гидроксипрегн-4-ен-3-он	—	17	35
3 α -Гидрокси-5 α -прегнан-20-он	32	—	51
3 α -Гидрокси-5 β -прегнан-20-он	61	—	41
3 β -Гидрокси-5 α -прегнан-20-он	39	—	50
3 β -Гидрокси-5 β -прегнан-20-он	27	—	45
20 α -Гидрокси-5 α -прегнан-3-он	53	—	43
20 α -Гидрокси-5 β -прегнан-3-он	100	—	38
20 β -Гидрокси-5 α -прегнан-3-он	53	—	59
20 β -Гидрокси-5 β -прегнан-3-он	95	—	56
Диолы			
Прегн-5-ен-3 β ,20 α -диол	—	15	21
Прегн-5-ен-3 β ,20 β -диол	—	15	27,5
5 α -Прегнан-3 α ,20 α -диол	—	15	35
5 α -Прегнан-3 α ,20 β -диол	—	16	44
5 α -Прегнан-3 β ,20 α -диол	—	15	29
5 α -Прегнан-3 β ,20 β -диол	—	13	38
5 β -Прегнан-3 α ,20 α -диол	—	26	29
5 β -Прегнан-3 α ,20 β -диол	—	22	38
5 β -Прегнан-3 β ,20 α -диол	—	14,5	27
5 β -Прегнан-3 β ,20 β -диол	—	14,5	38

стерона) 5 α -эпимера методом адсорбционной хроматографии.

б. Для разделения четырех дионов различной структуры можно использовать адсорбционную, но не распределительную хроматографию.

в. Для разделения 20-эпимеров моногидроксикетонов лучше всего применять обращенно-фазовую распределительную хроматографию.

г. Биохимически важное отделение прогестерона от прегненолона и 3 β -гидрокси-5 α -прегнан-20-она можно осуществить ме-

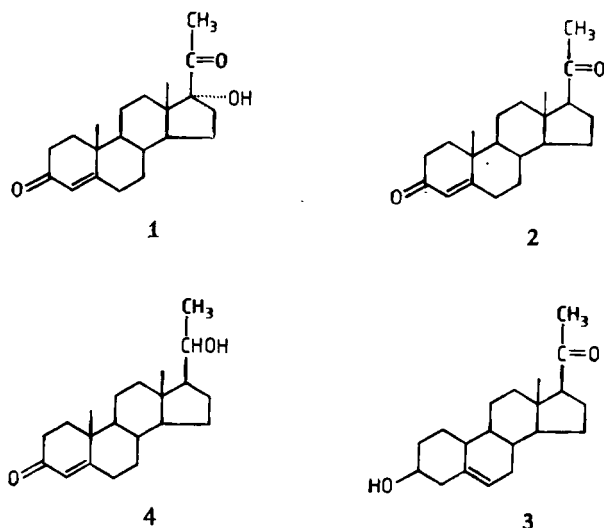


Рис. 11.5. Структуры некоторых прогестинов.

1 — 17α-гидроксипрогестерон; 2 — прогестерон; 3 — прегненолон; 4 — прег-4-ен-20β-ол-3-он.

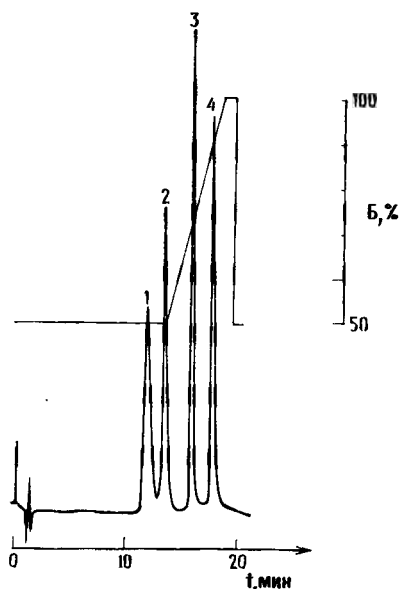


Рис. 11.16. Разделение аидростендиона (1), тестостерона (2), 17α-гидроксипрогестерона (3) и прогестерона (4) методом ВЭЖХ [41].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил PXS 10 ODS-2; элюент: А — вода/тетрагидрофуран (99:1); В — вода/тетрагидрофуран (1:1), 50% В и течение 9 мин, последующее увеличение концентрации В со скоростью 10% В/мин в течение 5 мин, далее до 100% В в течение 1 мин; объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: при 240 нм; проба: 24 мкг каждого стероида в 6 мкл растворителя.

тодом обращенно-фазовой хроматографии, но при использовании адсорбционной хроматографии указанное разделение затруднено.

д. Разделение диолов — наиболее полярных производных

прогестерона — возможно только при помощи адсорбционной хроматографии.

Как было недавно показано на примере отделения прогестерона от его метаболитов 17α -гидроксипрогестерона и тестостерона (рис. 11.16), градиентное элюирование увеличивает разрешающую способность ВЭЖХ при разделении прогестинов. Наиболее чувствительный метод определения прогестинов — это ВЭЖХ меченных радиоактивными изотопами прогестерона и его производных [40].

11.5. Кортикостероиды

Кортикостероиды, продуцируемые в коре надпочечников (adrenal cortex), в соответствии с их биологической активностью делятся на минералокортикостероиды (альдостерон и 11 -дезоксикорти-

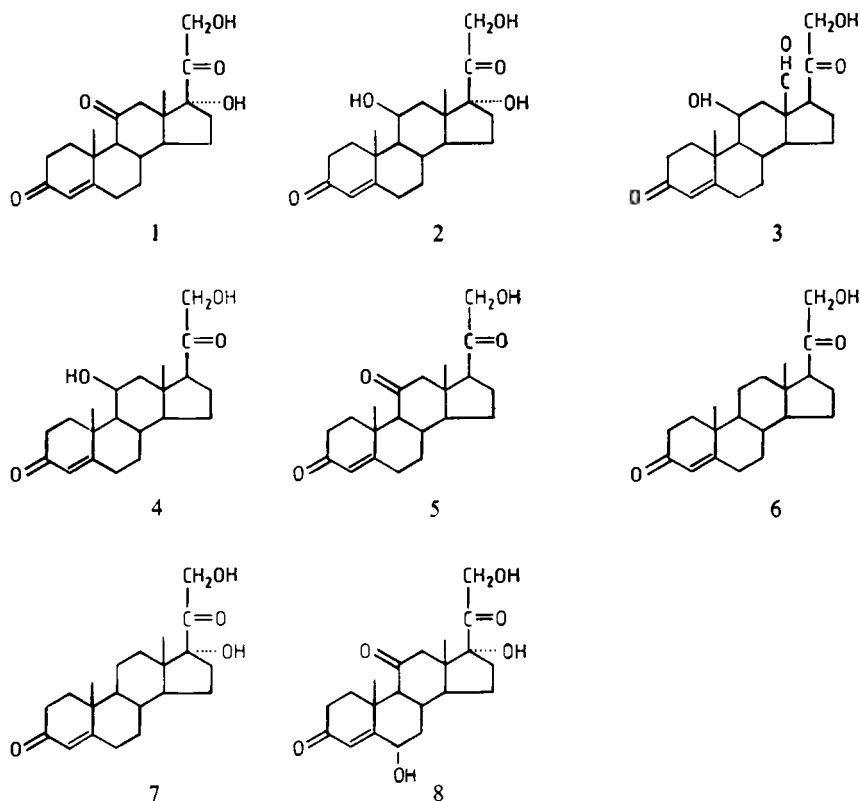


Рис. 11.17. Структуры некоторых кортикостероидов.

1 — кортизон; 2 — кортизол; 3 — альдостерон; 4 — кортикостерон; 5 — 11 -дегидрокортикостерон; 6 — 11 -дезоксикортикостерон; 7 — 11 -дезоксикортизол; 8 — 6β -гидроксикортизол.

Таблица 11.12. Время удерживания стероидов, включая кортикостероиды, при разделении методом ВЭЖХ [63]

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ODS; режим элюирования: градиентный ($Y=X^2$); элюент: А — от смеси метанол/вода (4:6) до 100%-ного метанола (50 мин), В — от смеси ацетонитрил/вода (8:25) до 100%-ного ацетонитрила (50 мин), В — от смеси диоксан/вода (1:4) до 100%-ного диоксана (50 мин); объемная скорость: от 0,38 до 0,67 (А), 0,80 (В) и 0,34 мл/мин (В); обнаружение: по поглощению при 240 (А, В) и 254 нм (В)

Стероид	t_R , мин		
	А	Б	В
6β-Гидрооксикортизол (6β,11β,17α,21-тетрагидрокси-прегн-4-ен-3,20-трион)	3	3,5	4
11-Дегидроальдостерон (21-гидроксипрегн-4-ен-18-аль-3,20-трион)	8	5	15
17-Изоальдостерон (11β,21-дигидрокси-17β-прегн-4-ен-18-аль-3,20-дион)	11	6	15
18-Гидрокси-11-дегидрокортикостерон (18,21-дигидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-трион)	11,5	6,5	17,5
Преднизон (17α,21-дигидрокси-прегна-1,4-диен-3,11,20-трион)	12	9	23
Альдостерон (11β,21-дигидрокси-прегн-4-ен-18-аль-3,20-дион)	13,5	8	19
Эстроил (эстра-1,3,5(10)-триен-3,16α,17β-триол)	14	8	25
Кортизон (17α,21-дигидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-трион)	14	9	25,5
19-Гидроксиандростендион (19-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион)	15	11,5	20
7α-Гидрокситестостерон (7α,17β-дигидроксиандрост-4-ен-3-он)	15,5	9	19,5
18-Гидрооксикортикостерон (11β,18,21-тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	15,5	7	21
Преднизолон (11β,17α,21-тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион)	15,5	9	26,5
Кортизол (11β,17α,21-тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	16	9	27
Адреностерон (андрост-4-ен-3,11,17-трион)	18	17	28
19-Гидрокситестостерон (17β,19-дигидроксиандрост-4-ен-3-он)	19	10	24
16α-Гидрокситестостерон (16α,17β-дигидроксиандрост-4-ен-3-он)	21	11	27
11-Дегидрокортикостерон (21-гидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-трион)	21,5	15	29,5
Дексаметазон (9-фтор-16α-метил-11β,17α,21-тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион)	24	13	35
11β-Гидроксиандростендион (11β-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион)	24	17	32
21-Дезоксикортизол (11β,17α-дигидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	26,5	16	34,5
Кортикостерон (11β,21-дигидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	31	18	36
11β-Гидрокситестостерон (16β,17β-дигидроксиандрост-4-ен-3-он)	31	15	33,5
18-Гидроксидезоксикортикостерон (18,21-дигидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	31,5	16	34,5
11-Дезоксикортизол (17α,21-дигидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	33	20	37,5
6α-Гидроксипрогестерон (6α-гидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	34	24,5	38,5
16α-Гидроксипрогестерон (16α-гидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион)	35	24	38
11-Кетопрогестерон (прегн-4-ен-3,11,20-трион)	37	30	40

Продолжение

Стероид	t_R , мин		
	A	B	B
Эстрон (3-гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он)	37	30,5	42,5
11 β -Гидрокси-20 α -дигидропрогестерон (11 β ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-он)	38	26	49
Андростендион (андрост-4-ен-3,17-дион)	39	36	42
6 β -Гидроксипрогестерон (6 β -гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион)	39	30	41
Эстрадиол (эстра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол)	40	29	43
11 β -Гидроксипрогестерон (11 β -гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион)	41	33	43
11-Дезоксикортикостерон (21-гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион)	41	36	43,5
17 α -Гидроксипрогестерон (17 α -гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион)	41,5	38	45
Тестостерон (17 β -гидроксиандрост-4-ен-3-он)	42	35	43,5
17 α -Гидрокси-20 α -дигидропрогестерон (17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-он)	42,5	32	42
17 α -Гидроксн-20 β -дигидропрогестерон (17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-он)	43	32,5	43,5
Дегидроэпиандростерон (3 β -гидрокснандрост-5-ен-17-он)	44	41	44
Андростендиол (андрост-5-ен-3 β ,17 β -диол)	45	38	—
17 α -Гидроксипрегненолон (3 β ,17 α -дигидроксипрегн-5-ен-20-он)	45,5	39	—
5 α -Дигидротестостерон (17 β -гидрокси-5 α -андростан-3-он)	46,5	42	—
Прогестерон (прегн-4-ен-3,20-дион)	47	45	49
20 α -Дигидропрогестерон (20 α -гидроксипрегн-4-ен-3-он)	47,5	43,5	47,5
20 β -Дигидропрогестерон (20 β -гидроксипрегн-4-ен-3-он)	48,5	46	49,5
Прегненолон (3 β -гидроксипрегн-5-ен-20-он)	48,5	47	50
Холестерин (холест-5-ен-3 β -ол)	54	60	—

зон) и глюкокортикоиды (кортизон и кортизол). Структурные формулы некоторых кортикостероидов представлены на рис. 11.17.

В одной из ранних работ по исследованию кортикостероидов методом ВЭЖХ адсорбционная ВЭЖХ (Sil-X) была с успехом применена для отделения кортизола от кортизона, вещества S Рейхштейна и андростендиона [42]. Начиная с этого времени в ряде лабораторий разделение производных прегнана проводят на колонках с силикагелем, элюируя их смесями дихлорметан/этанол/вода/метанол (963:20:12:5) [43], хлороформ/метанол (197:3) [44], хлороформ/метанол/вода (983:150:2) [45], дихлорметан/этанол/вода (19:0,95:0,05) [46], дихлорметан/этанол/вода (948:35:17) [47—49] или хлороформ/этанол (97:3) [50]. Колонки с обращенными фазами на основе силикагеля с химически привитыми алкил-, фенил-, нит-

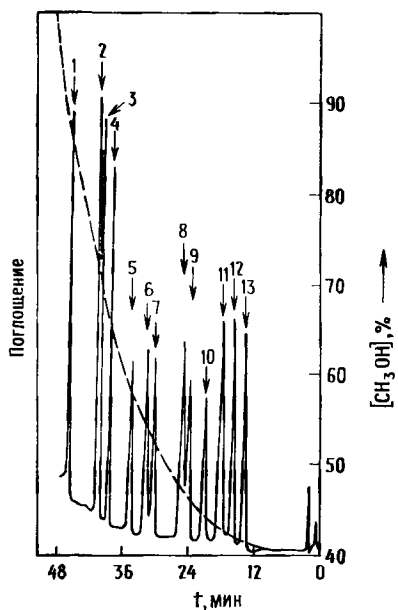


Рис. 11.18. Разделение стероидов коры надпочечников методом ВЭЖХ [63].

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: градиентное элюирование, начиная со смеси метанол/вода (4:6) до 100% метанола в течение 50 мин; объемная скорость: 0,38 (в начале) и 0,67 мл/мин (в конце); обнаружение: при 240 нм; проба: от 210 до 440 мкг каждого стероида.

1 — прогестерон; 2 — 17 α -гидроксипрогестерон; 3 — 11-дезоксикортикостерон; 4 — адростендион; 5 — 16 α -гидроксипрогестерон; 6 — 11-дезоксикортизол; 7 — кортикостерон; 8 — 21-дезоксикортизол; 9 — 11-гидроксандростендион; 10 — 11-дегидрокортикостерон; 11 — адреностерон; 12 — кортизол; 13 — кортизон.

ро-, цианопропил- и цианоэтилсилильными и т. д. группами также с успехом применялись для разделения производных прегнана методом ВЭЖХ [51—62]. Подходящими органическими модификаторами подвижной фазы являются такие спирты, как метанол и 2-пропанол, а также ацетонитрил и тетрагидрофуран.

В фундаментальном исследовании О'Хары и сотр. [63] определено время удерживания кортикостероидов и многих других стероидов при разделении на обращенной фазе (зорбакс ODS) с использованием различных подвижных фаз (табл. 11.12, рис. 11.18—11.20).

11.6. Определение стероидных гормонов в биологических жидкостях

Определению стероидных гормонов в биологических жидкостях методом ВЭЖХ посвящено очень большое число работ (см., например, определение кортикостероидов [64—71], тестостерона [72], эстрогенных гормонов [25, 27, 73]). В этих целях применяются колонки с такими обращенными фазами, как Sil-X-RP [64], гиперсил ODS [66], RP-8 [70, 76], μ -бондапак C₁₈ [72, 73], партисил-10 ODS [27], лихросорб C₂ [73], лихросорб RP-18 [73], а также силикагели [25, 27, 65, 67, 69, 70, 74, 75] или си-

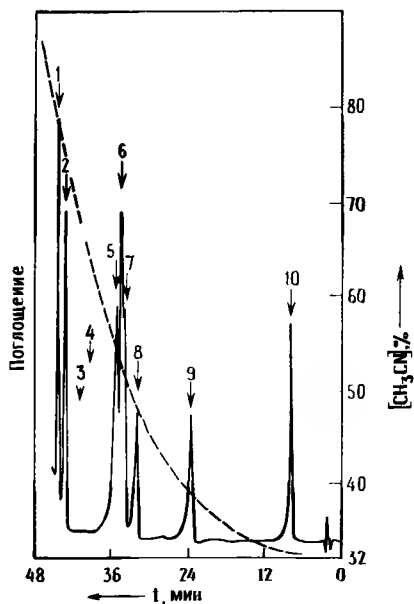


Рис. 11.19. Разделение тестикулярных стероидов методом ВЭЖХ [63].

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: градиентное элюирование, начиная со смеси ацетонитрил/вода (8:25) до 100% ацетонитрила в течение 50 мин; объемная скорость: 0,38 (в начале) и 0,80 мл/мин (в конце); обнаружение: при 240 нм; проба: от 330 до 750 мкг каждого стероида.
1 — прогестерон; 2 — 20 α -дигидропрогестерон; 3 — 5 α -дигидротестостерон; 4 — дегидроэпиандростерон; 5 — 17 α -гидроксипрогестерон; 6 — андростендион; 7 — тестостерон; 8 — 17 α -гидрокси-20 α -дигидропрогестерон; 9 — 16 α -гидроксипрогестерон; 10 — 7 α -гидрокси-тестостерон.

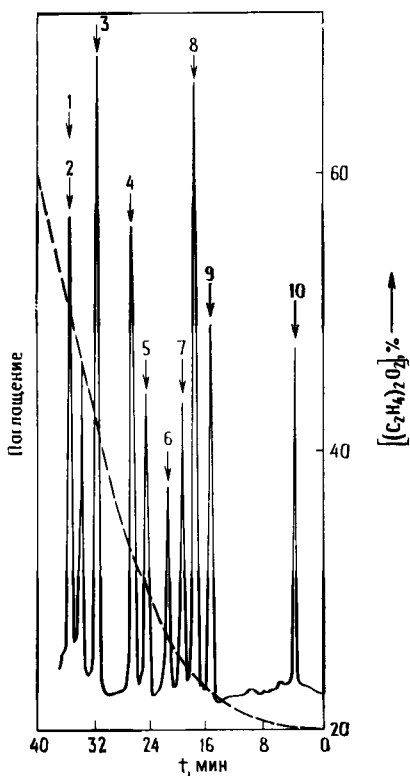


Рис. 11.20. Разделение полярных стероидов коры надпочечников методом ВЭЖХ [63].

Колонка: 250×2,1 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс ODS; элюент: градиентное элюирование, начиная со смеси диоксан/вода (1:4) и заканчивая диоксаном (100%) в течение 50 мин; объемная скорость: 0,38 (в начале) и 0,34 мл/мин (в конце); обнаружение: при 254 нм; проба: от 250 до 750 мкг каждого стероида.
1 — кортикостерон; 2 — 18-гидрокси-11-дезоксикортикостерон; 3 — 11 β -гидроксандростендион; 4 — кортизол; 5 — кортизон; 6 — 18-гидроксикортикостерон; 7 — альдостерон; 8 — 18-гидрокси-11-дегидрокортикостерон; 9 — 11-дегидроальдостерон; 10 — 6 β -гидроксикортизол.

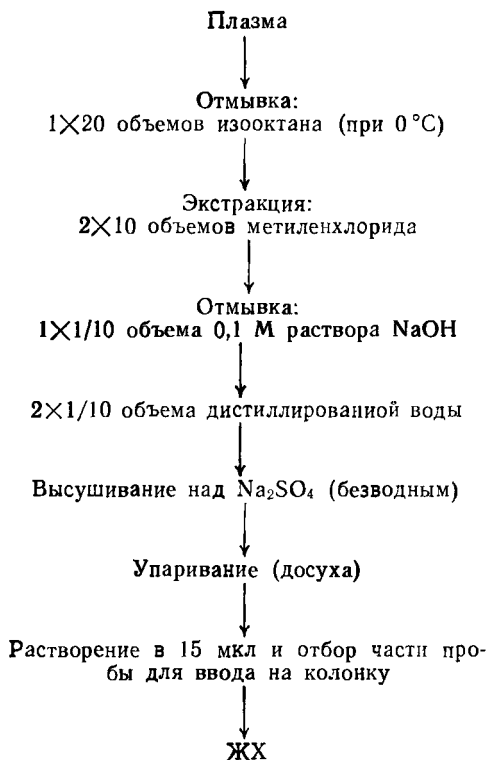


Рис. 11.21. Метод экстракции кортикостероидов [64].

ликагели, покрытые пленкой полярного соединения [68, 71, 73].

Прежде чем проводить анализ методом ВЭЖХ стероидов в биологических жидкостях, производные пергидроциклопентанофенантрена обычно экстрагируют органическими растворителями, например метилехлоридом [64, 67, 69, 76], диэтиловым эфиром [25, 27] и т. п. Выше показана типичная методика экстракции, используемая при определении кортикостероидов в 5 мл плазмы крови (рис. 11.21).

Концентрация эстрогенных стероидов в моче женщины в период беременности — чрезвычайно важный показатель ее состояния. В настоящее время разработаны способы определения эстрогенов в моче при помощи ВЭЖХ [25, 27, 73]. На рис. 11.22 и 11.23 показаны хроматограммы экстрактов мочи беременных женщин, полученные методом жидко-твёрдофазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ; рассчитанные концентрации эстрогенов в моче беременных и соответствующие им относительные стандартные отклонения даны в табл. 11.13.

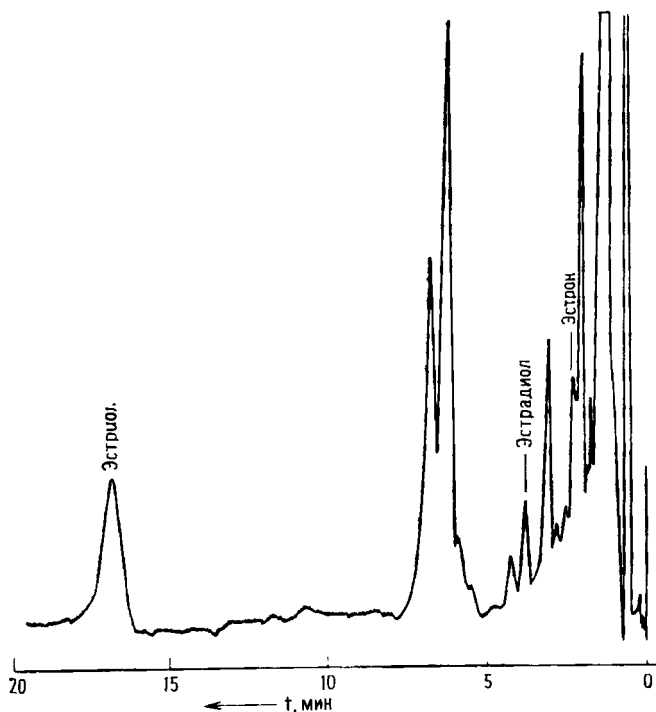


Рис. 11.22. Хроматограмма экстракта мочи беременной женщины (40 мл мочи гидролизовали концентрированной соляной кислотой и экстрагировали продукты гидролиза диэтиловым эфиром) [27].

Колонка: 150×4,9 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил 5 (7 мкм); подвижная фаза: этанол/*n*-гексан (5 : 95); объемная скорость: 5 мл/мин; обнаружение: при 280 нм.

ВЭЖХ также применима для количественного анализа 11-дезоксикортизола и кортизола в плазме крови при метирапоновом тесте [69]. Условия определения 11-дезоксикортизола и кортизола в плазме крови приведены в подписях к рис. 11.24 и 11.25. Подготовку пробы проводят следующим образом. К 0,6 мл плазмы крови добавляют 0,05 мл раствора гидроксида натрия в концентрации 3 моль/л и 100 нг преднизона или соответственно преднизолон. Далее добавляют 4 мл дихлорметана, инкубируют 5 мин, центрифугируют, отделяют слой органического растворителя и промывают его 1 М раствором соляной кислоты и водой. 3 мл экстракта упаривают досуха и осадок растворяют в 50 мкл хлороформа. Для проведения разделения методом ВЭЖХ используют пробу объемом 20 мкл (рис. 11.24 и 11.25).

Если разделение ведется на колонках, заполненных силикагелем с малым размером частиц, а элюентом служит смесь метанол/метиленхлорид (3 : 97), то за один хроматографический

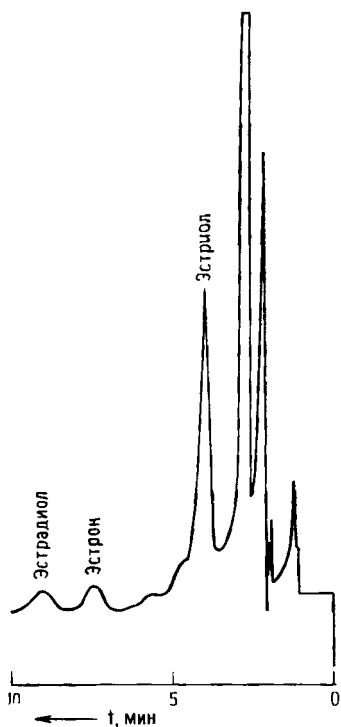


Рис. 11.23. Хроматограмма экстракта мочи беременной женщины (40 мл мочи гидролизовали концентрированной соляной кислотой и экстрагировали продукты гидролиза диэтиловым эфиром, эфир отгоняли досуха и осадок растворяли в 1 мл смеси метанол/0,1%-ный карбонат аммония (55:45) для последующего разделения методом ВЭЖХ) [17].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: партисил 10 ODS (10 мкм); элюент: 0,1% метанол/0,1%-ный водный раствор карбоната аммония (55:45); объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: при 280 нм.

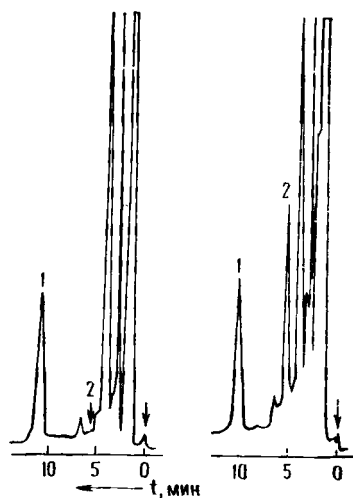


Рис. 11.24. Полученные методом ВЭЖХ хроматограммы экстрактов плазмы до (а) и после (б) введения метирапона (30 мг/кг массы тела, плазма взята через 8 ч после введения метирапона, методику приготовления образцов плазмы см. в тексте) [69].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: SI-10 (10 мкм); элюент: хлороформ/изооктан/метанол/вода (4,5:48,5:2,9:0,12); объемная скорость: 65 мл/ч; обнаружение: при 254 нм; 1 — преднизон (внутренний стандарт, см. текст); 2 — 11-дезоксикортизол.

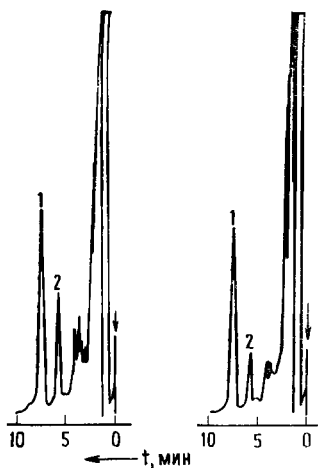


Рис. 11.25. Полученные методом ВЭЖХ хроматограммы экстрактов плазмы до (а) и после (б) введения метирапона (30 мг/кг массы тела, плазма взята через 8 ч после введения метирапона, методику приготовления образцов плазмы см. в тексте) [69].

Колонка: 250×3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: SI-10 (10 мкм); элюент: хлороформ/изооктан/метанол/вода (71 : 25 : : 3,75 : 0,25); объемная скорость: 65 мл/ч; обнаружение: при 254 нм; 1 — преднизолон (внутренний стандарт, см. текст); 2 — кортизол.

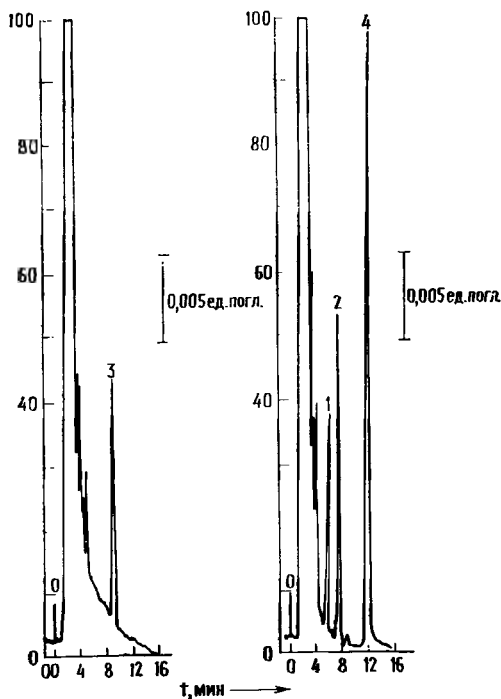


Рис. 11.26. Полученные методом ВЭЖХ хроматограммы экстрактов плазмы до (а) и после (б) введения преднизона (плазма взята через 3 ч после однократного перорального введения 50 мг преднизона, методику приготовления образцов плазмы см. в тексте) [67].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: зорбакс SIL (5—6 мкм); элюент: метанол/метилхлорид (3 : 97); объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: при 254 нм. 1 — преднизон; 2 — дексаметазон (внутренний стандарт); 3 — кортизол; 4 — преднизолол.

Таблица 11.13. Рассчитанные уровни эстрогенов в моче беременных и соответствующие им относительные стандартные отклонения (ОСО, см. рис. 11.22, 11.23) [27]

Соединение	Концентрация в моче, г/л	
	партикл 5	партикл 10 ODS
Эстрон	—	$7,3 \cdot 10^{-3}$ (ОСО 18%)
Эстрадиол	$1,8 \cdot 10^{-3}$ (ОСО 18%)	$2,5 \cdot 10^{-3}$ (ОСО 18%)
Эстриол	$33 \cdot 10^{-3}$ (ОСО 18%)	$30 \cdot 10^{-3}$ (ОСО 9%)

цикл в одной пробе экстракта плазмы крови методом ВЭЖХ можно определить преднизон, дексаметазон, кортизол и преднизолон. Для приготовления пробы 1 мл биологической жидкости экстрагируют 10 мл метиленхлорида. Перед разделением методом ВЭЖХ органический слой промывают раствором гидроксида натрия и водой (рис. 11.26) [67].

11.7. Исследование лекарственных средств стероидного ряда методом ВЭЖХ

В последнее время метод ВЭЖХ стал одним из наиболее важных методов анализа синтетических стероидных лекарственных средств. Например, на колонках с силикагелем проведено успешное разделение преднизона и преднизолона [75, 77], дексаметазона [77, 78] и ацетонида триамцинолона [79]. В литературе имеются многочисленные сообщения об исследованиях стероидных лекарственных средств методом ВЭЖХ на обращенных фазах (см., например, исследование преднизолона [80, 81], метилпреднизолона [45, 82], ацетонида триамцинолона [83], ацетата флюрокортизона [84], диацетата этиндиола [85], 17-валерата бетаметазона, 17-пропионата клобетазона, 17-бутирата клобетазона, дипропионата беклометазона, 21-динатрийфосфата бетаметазона, бетаметазона [86], будесонида и родственных кортикостероидов [53], 21-дегидропреднизолона [87] или тестолактона [88]).

В фундаментальной работе Хара и Хаяши [65] систематизированы экспериментальные данные и выявлена зависимость между химической структурой компонентов пробы и их характеристиками удерживания на силикагелевых и обращенных фазах. Чтобы можно было сравнивать характеристики удерживания всех стероидов, были вычислены относительные объемы удерживания с использованием тестостерона в качестве стандарта. Относительные объемы удерживания $V_R(A)_T$ рассчитывались по уравнению

$$\log V_R(A)_T = \log V_R(A) / V_R(T) \quad (5)$$

где $V_R(A)$ — абсолютный объем удерживания соединения А, $V_R(T)$ — абсолютный объем удерживания тестостерона.

Величину относительного удерживания $\log V_R(A)_T$ пробы А можно найти непосредственно путем сравнения с аналогичным параметром для тестостерона, если провести их разделение на корасиле II при элюировании смесью этилацетат/*n*-гексан (1 : 4). Если используется смесь тех же растворителей, но в иных пропорциях (например, этилацетат/*n*-гексан (1 : 9)), величину относительного удерживания пробы Б можно вычислить из значения этого параметра для соединения 30:

$$\begin{aligned} \log [V_R(B)/V_R(T)] &= \\ &= \log \frac{V_R(B)/V_R(30) \text{ [этилацетат/}n\text{-гексан (1 : 9)]}}{V_R(30)/V_R(T) \text{ [этилацетат/}n\text{-гексан (1 : 4)]}} \end{aligned} \quad (6)$$

Если соотношение компонентов смеси этилацетат/*n*-гексан изменится, например, до 1 : 19, для нахождения величины удерживания пробы В потребуется повторное экстраполирование пробы 4:

$$\begin{aligned} \log [V_R(B)/V_R(T)] &= \\ &= \log \frac{V_R(B)/V_R(4) \text{ [этилацетат/}n\text{-гексан (1 : 19)]}}{V_R(4)/V_R(30) \text{ [этилацетат/}n\text{-гексан (1 : 9)]}} \times \\ &\times \frac{1}{V_R(30)/V_R(T) \text{ [этилацетат/}n\text{-гексан (1 : 4)]}} \end{aligned} \quad (7)$$

Для двух соединений Р и Q, имеющих аналогичную структуру и отличающихся только функциональными группами, различие в относительных объемах удерживания $\Delta \log V_R$ составит

$$\Delta \log V_R = \log V_R(Q) - \log V_R(P) = \log k(Q) - \log k(P) \quad (8)$$

где $V_R(Q)$, $V_R(P)$ — объемы удерживания проб Р и Q, $k(Q)$, $k(P)$ — коэффициенты емкости проб Q и Р.

Разность $\Delta \log V_R$ можно также рассчитать из относительных объемов удерживания $\log V_R/V_R(T)$, выбрав тестостерон в качестве стандарта.

В табл. 11.14 приведены объемы удерживания стероидов и одной адсорбционной и двух обращенно-фазовых системах.

Для нахождения зависимости между характеристиками элюирования и химической структурой стероидов было проведено сравнение относительных объемов удерживания пар стероидов, имеющих аналогичную основную структуру и отличающихся на одну функциональную группу, для двух обращенно-фазовых и трех полярно-фазовых систем (рис. 11.27).

Исходя из этих данных, можно сделать следующие выводы.

а. Порядок элюирования зависит в основном от неподвижной, а не от подвижной фазы.

Таблица 11.14. Объемы удерживания лекарственных препаратов стероидного ряда [65]

Колонка: 600×2,3 мм (внутр. диаметр); обнаружение: по поглощению при 254 нм или рефрактометрическое; неподвижная фаза: А—Г—корасил 11, Д—М—бондапак C₁₈/корасил; элюент: А—Г—*n*-гексан/этилацетат (19:1, 9:1, 4:1 и 3:2 по объему), Д—Ж—метанол/вода (2:3, 1:1, 4:1 по объему), З—М—ацетонитрил/вода (1:9, 1:4, 3:7, 2:3 и 1:1 по объему)

Стероид	А	Б	В	Г	Стероид	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М
3,17β-Дипропионилокси-эстра-1,3,5(10)-триен	0,85	0,26			11β,16α,17α,21-Тетра-гидроксн-9α-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион	0,60			1,50	0,60			
3-Метокси-17α-этинил-эстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол	2,79	0,78			Эстра-1,3,5(10)-триен-3,16α,17β-триол (эстри-ол)	1,40			4,65	1,65			
17β-Валерилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол	2,79	0,82			17α,21-Дигидроксипрегна-4-ен-3,11,20-трион (кортизон)	2,00 ^а			7,10 ^а	2,70 ^а			
17β-Пропионилокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он	6,83	1,87			11β,17α,21-Тригидроксн-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)	2,20			6,30	2,20			
3-Бензоилокси-16α,17β-диацетоксиэстра-1,3,5(10)-триен	7,30 ^а	2,00 ^а	0,39		11β,17α,21-Тригидроксн-прегна-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	2,30			6,80	2,30			
17β-Ацетокси-4-хлор-андрост-4-ен-3-он	8,95	2,31	0,55		14α,17β-Дигидрокснанд-рост-4-ен-3-он	3,10				3,50			
17α-Этилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол	9,98	2,77	0,69		6β,17β-Дигидрокснанд-рост-4-ен-3-он	3,40				2,90			
17β-Пропионилоксианд-рост-4-ен-3-он	10,83	3,00	0,80		11β,17α,21-Тригидроксн-16β-метил-9α-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион	4,30				5,30			
3-Гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он (эстрон)	11,84	3,23	0,92		11β,17α,21-Тригидроксн-16α-метил-9α-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион	4,60				5,60			

17β-Ацетоксиандрост-4-ен-3-он	3,70	0,96	14α-Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион	4,60		12,10		
17β-Ацетокси-1-метил-андрост-1-ен-3-он	3,71	0,96	11β,17α,21-Тригидрокси-6β-метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион	4,90		4,80		
17β-[β-(Фенилпропионил-окси)]-эстр-4-ен-3-он	4,21	1,12	17α-Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона)	7,40	2,20	19,40	3,65	
17β-[β-(2-Фурилпропионил-окси)]-эстр-4-ен-3-он	4,21	1,12	11β,17α-Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона)	7,80	2,30	13,20 ^a	2,50 ^a	
3-Бензоилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол	4,58	1,28	3-Гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он (эстрон)		3,90		4,80	
17β-Гидрокси-6α-метил-17α-(1-пропионил)-андрост-4-ен-3-он	6,85	1,52	17α-Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол		4,00		4,60	
17α-Капроилоксипрегн-4-ен-3,20-дион	6,85	1,53	11β,17α-Дигидрокси-21-ацетокси-16α-метил-6α,9α-дифторпрегна-1,4-диен-3,20-дион		4,10	22,40	4,18	
Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол	6,88	1,57	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)		4,40	18,60	3,40	
Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)	7,00 ^a	1,73 ^a	17β-Гидрокси-эстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)		5,45			1,65
17β-Гидрокси-17α-этиниландрост-4-ен-3-он	8,13	2,00	17β-Гидрокси-17α-этинилэстр-4-ен-3-он		5,50		4,80 ^a	1,25 ^a
17β-Гидрокси-17α-этинилэстр-4-ен-3-он	10,25	2,60	17β-Гидрокси-17α-этиниландрост-4-ен-3-он		6,00			1,30
9β,10α-Прегна-4,6-диен-3,20-дион	10,25	2,60	17β-Гидрокси-17α-метил-андроста-1,4-диен-3-он		6,00			1,35
17α-Ацетокси-6-метилпрегна-4,6-диен-3,20-дион		3,30	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)		7,40 ^a		1,70	0,75

Стероид	А	Б	В	Г	Стероид	Д	Е	Ж	З	И	К	Л	М
17β-Гидрокси-17α-этил-эстр-4-ен-3-он			3,77		17β-Гидрокси-17α-метил-эстр-4-ен-3-он		9,50					2,02	0,95
17β-Гидрокси-17α-метил-андрост-4-ен-3-он			3,92		17β-Гидрокси-17α-метил-андрост-4-ен-3-он		11,50					2,30	1,02
17β-Гидрокси-17α-метил-эстр-4-ен-3-он			5,10	0,96	17β-Гидрокси-6α-метил-17α-(1-пропинил)-андрост-4-ен-3-он		20,40					4,70	1,60
17α-Ацетокси-6-хлор-прегна-4,6-диен-3,20-дион			5,10	1,02	17β-Гидрокси-17α-этил-эстр-4-ен-3-он		20,80					4,00	1,35
17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)			5,20 ^а	1,10 ^а	9β,10α-Прегна-4,6-диен-3,20-дион		22,10					5,00	1,65
17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)			6,20	1,15	17α-Ацетокси-6-метил-прегна-4,6-диен-3,20-дион		24,60					5,60	1,70
17β-Гидрокси-17α-метил-андроста-1,4-диен-3-он			8,10	1,68	17α-Ацетокси-6-хлор-прегна-1,4-диен-3,20-дион		27,80 ^а	1,15 ^а				5,73 ^а	1,75 ^а
17α-Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона)				2,20	Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)			1,25					2,58
17β,17α-Дигидрокси-21-ацетокси-16α-метил-6α,9α-дифторпрегна-1,4-диен-3,20-дион				2,45	17β-Ацетоксиандрост-4-ен-3-он			1,40					4,00
14α-Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион				2,45	3-Метокси-17α-этинил-эстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол			1,50					2,20
11β,17α-Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-				2,50	17β-Ацетокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он			1,55					4,90

3,20-дион (ацетат гидрокортизона)									
6β,17β-Дигидроксандрост-4-ен-3-он	3,55	17α-Капроилокси-прегн-4-ен-3,20-дион	1,65						8,10
11β,17α,21-Тригидрокси-16α-метил-9α-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион	3,65	17β-Ацетокси-1-метил-андрост-1-ен-3-он	1,70						5,10
11β,17α,21-Тригидрокси-16β-метил-9α-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион	3,65	17β-Пропионилоксиандрост-4-ен-3-он	1,75						7,60
17α,21-Дигидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-трион (кортизон)	4,71 ^a	17β-Пропионилокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он	1,85						8,30
Эстр-1,3,5(10)-триен-3,16α,17β-триол (эстриол)	6,60	17β-[β-(2-Фурилпропионилокси)]-эстр-4-ен-3-он	2,00						8,52
11β,17α,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	6,90	17β-Валерилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол	2,35						9,35
11β,17α,21-Тригидрокси-6β-метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион	7,80	17β-[β-(Фенилпропионилокси)]-эстр-4-ен-3-он	2,95						15,30
14α,17β-Дигидроксандрост-4-ен-3-он	8,20	3-Бензоилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол	3,10						11,15
11β,17α,21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)	8,70	3-Бензоилокси-16α,17β-диацетоксиэстра-1,3,5(10)-триен	3,30						14,92
11β,16α,17α,21-Тетрагидрокси-9α-фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион	9,05	3,17β-Дипропионилоксиэстра-1,3,5(10)-триен	3,50						19,27

^a Внутренний стандарт.

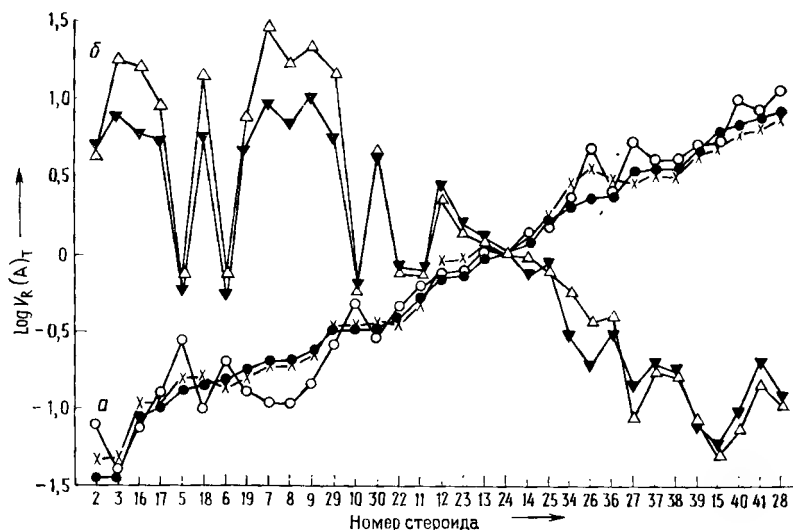


Рис. 11.27. Относительные времена удерживания лекарственных соединений стероидного ряда [65].

а) Колонка: 600×2,3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: корасил 11; элюенты: *n*-гексан/этилацетат (1), *n*-гексан/диэтиловый эфир (2) и *n*-гексан/2-пропанол (3); объемная скорость: 1,0 мл/мин.

б) Колонка 600×2,3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: бондапак C_{18} корасил; элюенты: метанол/вода (4), ацетонитрил/вода (5); объемная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 254 нм или рефрактометрическое. Проба (номера стероидов, указанные на оси абсцисс): 2 — 3-метокси-17 α -этинилэстра-1,3,5(10)-триен-17 β -ол; 3 — 17 β -валерилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол; 16 — 17 β -пропионилокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он; 17 — 17 β -ацетокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он; 5 — 17 α -этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17-диол; 18 — 17 β -пропионилоксиандрост-4-ен-3-он; 6 — 3-гидроксэстра-1,3,5(10)-триен-17-он (эстрон); 19 — 17 β -ацетоксиандрост-4-ен-3-он; 7 — 17 β -[β -(фенилпропионилокси)]-эстра-4-ен-3-он; 8 — 17 β -[2-фурилпропионилокси]-эстра-4-ен-3-он; 9 — 3-бензоилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-17 β -ол; 29 — 17 α -капроилоксипрегн-4-ен-3,20-дион; 10 — эстра-1,3,5(10)-триен-3,17-диол (эстрадиол); 30 — прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон); 22 — 17 β -гидрокси-17 α -этиниландрост-4-ен-3-он; 23 — β -гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он; 12 — 17 β -гидрокси-17 α -этилэстр-4-ен-3-он; 23 — 17 β -гидрокси-17 α -метиландрост-4-ен-3-он; 13 — 17 β -гидрокси-17 α -метилэстр-4-ен-3-он; 24 — 17 β -гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон); 14 — 17 β -гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон); 25 — 17 β -гидрокси-17 α -метиландрост-1,4-диен-3-он; 34 — 17 α -гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона); 26 — 14 α -гидроксандрост-4-ен-3,17-дион; 36 — 11 β ,17 α -дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона); 27 — 6 β ,17 β -дигидроксиандрост-4-ен-3-он; 37 — 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-16 α -метил-9 α -фторпрегн-1,4-диен-3,20-дион; 38 — 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-16 β -метил-9 α -фторпрегн-1,4-диен-3,20-дион; 39 — 17 α ,21-дигидроксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (кортизон); 15 — эстра-1,3,5(10)-триен-3,16 α ,17 β -триол (эстриол); 40 — 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-16 α -метил-9 α -фторпрегн-1,4-диен-3,20-дион (гидрокортизон); 41 — 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-6 β -метилпрегн-1,4-диен-3,20-дион; 28 — 14 α ,17 β -дигидроксиандрост-4-ен-3-он; 42 — 11 β ,17 α ,21-тригидрокси-16 α -метил-9 α -фторпрегн-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон).

● 1, × 2, □ 3, ▼ 4, △ 5.

б. Порядок элюирования в обращенно-фазовой системе, как правило, противоположен порядку элюирования в адсорбционной системе.

в. Различия в порядке элюирования при использовании различных подвижных фаз при разделении на обращенных фазах относительно невелики.

г. При разделении на обращенных фазах подвижные фазы метанол/вода и ацетонитрил/вода дают параллельные величины удерживания.

д. При разделении на силикагелевых колонках наблюдается большее различие в последовательности удерживания при использовании различных систем растворителей.

Рассчитанные или измеренные параметры удерживания для соединений с различными функциональными группами приведены в табл. 11.14 и 11.15. Анализ этих данных показывает следующее:

а. Гидроксильные группы в положениях 6 β , 14 α и 16 α дают большие абсолютные значения параметров для обеих неподвижных фаз.

б. Ацилирование спиртовых гидроксильных групп также дает соединения с большими абсолютными значениями параметров для обеих неподвижных фаз.

в. Алкилирование и ацилирование гидроксильных групп при ароматическом кольце дает производные с экстремально большими положительными значениями параметров в обращенно-фазовых системах.

г. Введение алкильной группы в 17 α -положение стероида, имеющего β -гидроксильную группу, дает производные с положительными значениями параметров, возрастающими от метила к этилу в обращенно-фазовых системах.

д. Восстановление карбониллов C-11 и C-17 с образованием β -гидроксильных групп дает соединения, имеющие малые абсолютные значения параметров в обращенно-фазовых и большие в полярно-фазовых системах.

е. Введение хлора в положение 4 3-окси-4-еновых стероидов дает соединения с положительными и отрицательными значениями параметров в обращенно-фазовой и полярно-фазовой системах соответственно.

ж. Введение метильной группы в положение 6 β и 10 β дает соединения с положительными и отрицательными значениями параметров в обращенно-фазовой и полярно-фазовой системах соответственно.

Таблица 11.15. Параметры удерживания стероидов с немодифицированными

Колонка: 600×2,3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: бондапак C₁₈/корасил; объем чesкое

Функциональная группа		Стероид	
немодиф.	модиф.	немодиф.	модиф.
6β-Н	ОН	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	6β,17β-Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
14α-Н	ОН	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	14α,17β-Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
16α-Н	ОН	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,16α,17β-триол (эстриол)
17β-ОН	ОСОСН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Ацетоксиандрост-4-ен-3-он
17β-ОН	ОСОС ₂ Н ₅	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он	17β-Пропионилоксиандрост-4-ен-3-он
17β-ОН	ОСО(СН ₂) ₃ СН ₃	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	17β-Валерилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол
17β-ОН	ОСО(СН ₂) ₂ С ₆ Н ₅	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-[β-(Фенилпропионил-оксн)]-эстр-4-ен-3-он
17β-ОН	ОСО(СН ₂) ₂ С ₄ Н ₄ О	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-[β-(Фурилпропионил-окси)]-эстр-4-ен-3-он
21-ОН	ОСОСН ₃	17α,21-Дигидроксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (кортизон)	17α-Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона)
21-ОН	ОСОСН ₃	11β,17α,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	11β,17α-Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона)
17β-ОН	ОСОН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)
3-ОН	ОСН ₃	17α-Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол	3-Метокси-17α-этинилэстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол
3-ОН	ОСОС ₆ Н ₅	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	3-Бензоилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол
17α-Н	СН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Гидрокси-17α-метиландрост-4-ен-3-он
17α-Н	СН ₃	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-Гидрокси-17α-метилэстр-4-ен-3-он
17α-Н	С ₂ Н ₅	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-Гидрокси-17α-этилэстр-4-ен-3-он
17α-Н	Этинил	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	17α-Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол
17α-Н	Этинил	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Гидрокси-17α-этиниландрост-4-ен-3-он

и модифицированными функциональными группами [65]

ная скорость: 1,5 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 254 нм или рефрактометри-

Метанол/вода (по объему) (указано в скобках)			Ацетонитрил/вода (по объему) (указано в скобках)		
$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл	
	немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.
—0,83 (1 : 1)	7,40	1,10	—1,08 (расч.)	1,70(2:3)	2,90(1:4)
—0,91 (расч.)	7,40(1:1)	3,10(2:3)	—0,99 (расч.)	1,70(2:3)	3,50(1:4)
—1,03 (расч.)	4,40(1:1)	1,40(2:3)	—1,05 (1 : 4)	18,60	1,65
0,66 (расч.)	7,40(1:1)	1,40(4:1)	0,69 (2 : 3)	1,70	8,40
0,76 (расч.)	7,40(1:1)	1,75(4:1)	1,01 (1 : 1)	0,75	7,60
1,11 (расч.)	4,40(1:1)	2,35(4:1)	1,54 (расч.)	3,40(3:7)	9,35(1:1)
1,12 (расч.)	5,45(1:1)	2,95(4:1)	1,48 (расч.)	1,65(2:3)	15,30(1:1)
0,95 (расч.)	5,45(1:1)	2,00(4:1)	1,23 (расч.)	1,65(2:3)	8,52(1:1)
0,57 (расч.)	2,00(2:3)	2,20(1:1)	0,86 (1 : 4)	2,70	19,40
0,53 (2 : 3)	2,30	7,80	0,76 (1 : 4)	2,30	13,20
0,61 (расч.)	7,40(1:1)	1,25(4:1)	0,54 (1 : 1)	0,75	2,58
0,96 (расч.)	4,00(1:1)	1,50(4:1)	0,78 (расч.)	4,60(3:7)	2,20(1:1)
1,23 (расч.)	4,40(1:1)	3,10(4:1)	1,62 (расч.)	3,40(3:7)	11,15(1:1)
0,19 (1 : 1)	7,40	11,50	0,13 (2 : 3)	1,70	2,30
0,24 (1 : 1)	5,45	9,50	0,09 (2 : 3)	1,65	2,02
0,58(1:1)	5,45	20,80	0,39(2:3)	1,65	4,00
—0,04(1:1)	4,40	4,00	0,13(3:7)	3,40	4,60
—0,09(1:1)	7,40	6,00	—0,12(2:3)	1,70	1,30

Функциональная группа		Стероид	
немодиф.	модиф.	немодиф.	модиф.
17 α -Н	Этинил	17 β -Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он
17 α -Н	OSO(CH ₂) ₄ CH ₃	Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)	17 α -Капроилоксипрегн-4-ен-3-он
17 α -Этинил	C ₂ H ₅	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -этилэстр-4-ен-3-он
C ₁₁ =O	11 β -ОН	17 α ,21-Дигидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-триен (кортизон)	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)
C ₁₁ =O	11 β -ОН	17 α -Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-триен (ацетат кортизона)	11 β ,17 α -Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона)
C ₁₇ =O	17 β -ОН	3-Гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он (экстрон)	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол (эстрадиол)
C ₁₇ =O	17 β -ОН	14 α -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион	14 α ,17 β -Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
4-Н	Cl	17 β -Ацетоксияндрост-4-ен-3-он	17 β -Ацетокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он
4-Н	Cl	17 β -Пропионилоксиандрост-4-ен-3-он	17 β -Пропионилокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он
Насыщ. ^{1,2}	$\Delta^{1,2}$	17 β -Гидрокси-17 α -метиландрост-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -метиландрост-1,4-диен-3-он
Насыщ. ^{1,2}	$\Delta^{1,2}$	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)
6 β -Н	CH ₃	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-6 β -метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17 β -Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидрокси-17 α -метилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -метиландрост-4-ен-3-он
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -этиниландрост-4-ен-3-он
16 α -CH ₃	β -CH ₃	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-16 α -метил-9 α -фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-16 β -метил-9 α -фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион

Метанол/вода (по объему) (указано в скобках)			Ацетонитрил/вода (по объему) (указано в скобках)		
$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл	
	немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.
0,00(1:1)	5,45	5,50	—0,12(2:3)	1,65	1,25
0,12(4:1)	1,25	1,65	0,50(1:1)	2,58	8,10
0,58(1:1)	5,50	20,80	0,51(2:3)	1,25	4,00
0,06(2:3)	2,00	2,30	—0,07(1:4)	2,70	2,30
0,02(1:1)	2,20	2,30	—0,17(1:4)	19,40	13,20
0,05(1:1)	3,90	4,40	—0,15(3:7)	4,80	3,40
—0,17(2:3)	4,60	3,10	—0,54(1:4)	12,10	3,50
0,04(4:1)	1,40	1,55	0,09(1:1)	4,00	4,90
0,02(4:1)	1,75	1,85	0,04(1:1)	7,60	8,30
—0,28(1:1)	11,50	6,00	—0,23(2:3)	2,30	1,35
—0,02(2:3)	2,30	2,20	—0,02(1:4)	2,30	2,20
0,35(2:3)	2,20	4,90	0,34(1:4)	2,20	4,80
0,13(1:1)	5,45	7,40	0,01(2:3)	1,65	1,70
0,08(1:1)	9,50	11,50	0,03(1:1)	0,95	1,02
0,04(1:1)	5,50	6,00	0,02(2:3)	1,25	1,30
—0,03(2:3)	4,60	4,30	—0,02(1:4)	5,60	5,30

Таблица 11.16. Параметры удерживания стероидов с

Колодка: 600×2,3 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: корасил II; объемная ско

Функциональная группа		Стероид	
немодиф.	модиф.	немодиф.	модиф.
6β-H	ОН	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	6β,17β-Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
14α-H	ОН	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	14α,17β-Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
16α-H	ОН	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,16α,17β-триол (эстриол)
17β-OH	ОСОСН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Ацетоксиандрост-4-ен-3-он
17β-OH	ОСОС ₂ H ₅	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Пропионилоксиандрост-4-ен-3-он
17β-OH	ОСО(CH ₂) ₃ CH ₃	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	17β-Валерилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-3-ол
17β-OH	ОСО(CH ₂) ₂ C ₆ H ₅	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-β-(Фенилпропионил-окси)]-эстр-4-ен-3-он
17β-OH	ОСО(CH ₂) ₂ C ₄ H ₄ O	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-β-(2-Фурилпропионилокси)]-эстр-4-ен-3-он
21-OH	ОСОСН ₃	17α,21-Дигидроксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (кортизон)	17α-Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона)
21-OH	ОСОСН ₃	11β,17α,21-Тригидроксипрегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	11β,17α-Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона)
17β-OH	СОСН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)
3-OH	ОСН ₃	17α-Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол	3-Метоксипрегн-4-ен-3,17β-диол
3-OH	ОСОС ₆ H ₅	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	3-Бензоилоксиэстра-1,3,5(10)-триен-17β-ол
17α-H	СН ₃	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Гидрокси-17α-метиландрост-4-ен-3-он
17α-H	СН ₃	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-Гидрокси-17α-метилэстр-4-ен-3-он
17α-H	C ₂ H ₅	17β-Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17β-Гидрокси-17α-этилэстр-4-ен-3-он
17α-H	Этинил	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол (эстрадиол)	17α-Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17β-диол
17α-H	Этинил	17β-Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)	17β-Гидрокси-17α-этилиандрост-4-ен-3-он

немодифицированными и модифицированными группами [65]

рость: 1 мл/мин; обнаружение: по поглощению при 254 нм или рефрактометрическое

н-Гексан/этилацетат (по объему) (указано в скобках)			н-Гексан/эфир (по объему) (указано в скобках)			н-Гексан/2-пропанол (по объему) (указано в скоб- ках)		
$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл	
	немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.
0,51(3:2)	1,10	3,55	0,44(1:1)	2,10	5,78	0,73(15:1)	0,62	3,29
0,87(3:2)	1,10	8,20	0,87(0:1)	0,35	2,60	1,06(15:1)	0,62	7,10
1,30(расч.)	1,57 (4:1)	6,60 (3:2)	1,21(расч.)	1,06 (3:2)	9,55 (1:1)	0,85(15:1)	0,50	3,50
-0,73(4:1)	5,20	0,96	-0,72(расч.)	3,78 (3:2)	1,67 (4:1)	-0,89(50:1)	6,99	0,90
-0,81(4:1)	5,20	0,80	-0,79(расч.)	3,78 (3:2)	1,63 (4:1)	-1,00(50:1)	6,99	0,70
-0,92(9:1)	6,88	0,82	-0,87(4:1)	3,10	0,42	-1,08(50:1)	3,40	0,28
-0,74(4:1)	6,20	1,12	-0,82(3:2)	4,80	0,73	-1,06(50:1)	9,15	0,80
-0,74(4:1)	6,20	1,12	-0,82(3:2)	4,80	0,73	-1,06(50:1)	9,15	0,80
-0,33(3:2)	4,71	2,20	-0,40(1:3)	9,10	3,60	-0,36(15:1)	3,10	1,35
-0,44(3:2)	6,90	2,50	-0,49(1:3)	11,90	3,85	-0,62(15:1)	6,10	1,45
-0,48(4:1)	5,20	1,73	-0,45(3:2)	3,78	1,35	-0,52(50:1)	6,99	2,10
-0,55(9:1)	2,77	0,78	-0,51(4:1)	1,35	0,42	-0,42(50:1)	1,50	0,57
-0,18(9:1)	6,88	4,58	-0,21(4:1)	3,10	1,91	-0,53(50:1)	3,40	1,00
-0,12(4:1)	5,20	3,92	-0,03(1:1)	2,10	1,96	-0,12(50:1)	6,99	5,37
-0,09(4:1)	6,20	5,10	-0,01(1:1)	2,50	2,47	-0,10(50:1)	9,15	7,32
-0,22(4:1)	6,20	3,77	-0,15(3:2)	4,80	3,44	-0,25(50:1)	9,15	5,19
-0,40(9:1)	6,88	2,77	-0,36(4:1)	3,10	1,35	-0,24(50:1)	3,40	1,96
-0,42(4:1)	5,20	2,00	-0,42(1:1)	2,10	0,80	-0,35(50:1)	6,99	3,12

Функциональная группа			
немодиф.	модиф.	немодиф.	модиф.
17 α -Н	Этинил	17 β -Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он
17 α -Н	ОСО(CH ₂) ₄ CH ₃	Прегн-4-ен-3,20-дион (прогестерон)	17 α -Капроилоксипрегн-4-ен-3,20-дион
17 α -Этинил C ₁₁ =О	C ₂ H ₅	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -этилэстр-4-ен-3-он
C ₁₁ =О	11 β -ОН	17 α ,21-Дигидрокси-прегн-4-ен-3,11,20-трион (кортизон)	17 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)
C ₁₁ =О	11 β -ОН	17 α -Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион (ацетат кортизона)	11 β ,17 α -Дигидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,20-дион (ацетат гидрокортизона)
C ₁₇ =О	17 β -ОН	3-Гидроксиэстра-1,3,5(10)-триен-17-он (эстрон)	Эстра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол (экстрадиол)
C ₁₇ =О	17 β -ОН	14 α -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион	14 α ,17 β -Дигидроксиандрост-4-ен-3-он
4-Н	Cl	17 β -Ацетоксиандрост-4-ен-3-он	17 β -Ацетокси-4-хлораидрост-4-ен-3-он
4-Н	Cl	17 β -Пропионилоксиандрост-4-ен-3-он	17 β -Пропионилокси-4-хлорандрост-4-ен-3-он
Насыщ. ^{1,2}	$\Delta^{1,2}$	17 β -Гидрокси-17 α -метиландрост-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -метиландроста-1,4-диен-3-он
Насыщ. ^{1,2}	$\Delta^{1,2}$	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегн-4-ен-3,20-дион (гидрокортизон)	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)
6 β -Н	CH ₃	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-прегна-1,4-диен-3,20-дион (преднизолон)	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-6 β -метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидроксиэстр-4-ен-3-он (19-нортестостерон)	17 β -Гидроксиандрост-4-ен-3-он (тестостерон)
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидрокси-17 α -метилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -метиландрост-4-ен-3-он
10 β -Н	CH ₃	17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он	17 β -Гидрокси-17 α -этиниландрост-4-ен-3-он
16 α -CH ₃	β -CH ₃	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-16 α -метил-9 α -фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион	11 β ,17 α ,21-Тригидрокси-16 β -метил-9 α -фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион

н-Гексан/этилацетат (по объему) (указано в скобках)			н-Гексан/эфир (по объему) (указано в скобках)			н-Гексан/2-пропанол (по объему) (указано в скоб- ках)		
$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл		$\Delta \log V_R$	V_R , мл	
	немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.		немодиф.	модиф.
-0,38(4:1)	6,20	2,60	-0,44(3:2)	4,80	1,76	-0,31(50:1)	9,15	4,50
-0,05(4:1)	1,73	1,53	-0,02(3:2)	1,35	1,30	-0,06(50:1)	2,10	1,84
0,16(4:1)	2,60	3,77	0,29(3:2)	1,75	3,44	0,06(50:1)	4,50	5,19
0,17(3:2)	4,71	6,90	0,12(1:3)	9,10	11,90	0,29(15:1)	3,10	6,10
0,06(3:2)	2,20	2,50	0,03(1:3)	3,60	3,85	0,03(15:1)	1,35	1,45
0,33(9:1)	3,23	6,88	0,39(4:1)	1,27	3,10	0,39(50:1)	1,40	3,40
0,53(3:2)	2,45	8,20	0,39(0:1)	1,05	2,60	0,38(15:1)	2,95	7,12
-0,21(9:1)	3,70	2,31	-0,22(4:1)	1,57	1,00	-0,11(50:1)	0,90	0,70
-0,21(9:1)	3,00	1,87	-0,20(4:1)	1,63	1,03	-0,11(50:1)	0,70	0,54
0,32(4:1)	3,92	8,10	0,26(1:1)	1,95	3,53	0,34(50:1)	5,37	11,69
0,12(3:2)	6,90	8,70	0,17(0:1)	1,38	2,05	-0,08(15:1)	6,10	5,10
-0,05(3:2)	8,70	7,80	-0,04(0:1)	2,05	1,86	0,00(15:1)	5,10	5,10
-0,08(4:1)	6,20	5,20	-0,10(3:2)	4,80	3,78	-0,12(50:1)	9,10	6,99
-0,11(4:1)	5,10	3,92	-0,10(1:1)	2,47	1,96	-0,14(50:1)	7,36	5,39
-0,11(4:1)	2,60	2,00	-0,13(3:2)	1,76	1,31	-0,16(50:1)	4,50	3,12
0,00(3:2)	3,65	3,65	0,00(0:1)	0,96	0,96	0,00(15:1)	2,17	2,17

Литература

1. Fieser L., Fieser M., Steroids: Van Nostrand-Reinhold, Princeton, New Jersey, 1959.
2. Shoppee C. W. Chemistry of the Steroids. Butterworth, London, 1964.
3. Klyne W. The Chemistry of the Steroids, Wiley, New York, 1957.
4. Heftman E. Biochemistry of Steroids. Van Nostrand-Reinhold, Princeton, New Jersey, 1960.
5. Carstensen H. Steroid Hormone Analysis. Marcel Dekker, New York, 1967.
6. Bush J. E. The Chromatography of Steroids. Pergamon, Oxford, 1961.
7. Neher R. Steroid Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1964.
8. Neher R. in: Giddings J. C., Keller R. A. (eds.) Advances in Chemistry, vol. 4, Marcel Dekker, New York, 1967.
9. Siggia S., Dishman R. A. Anal. Chem., **42**, 1223 (1970).
10. Huettemann R. E., Shroff A. P. J. Chromatogr. Sci., **13**, 357 (1975).
11. Frischkorn C. G. B., Frischkorn H. E. J. Chromatogr., **151**, 331 (1978).
12. Frischkorn C. G. B., Dürbeck H. W. Fresenius' Z. Anal. Chem., **290**, 160 (1978).
13. Dürbeck H. W., Frischkorn C. G. B., Frischkorn H. E. Deutsch. Z. Sportmed., **29**, 97 (1978).
14. Gasparrini F., Cacchi S., Caglioti L., Misti D., Giovannoli M. J. Chromatogr., **194**, 239 (1980).
15. Van der Hoeven T. A. J. Chromatogr., **196**, 494 (1980).
16. Higgins J. E. J. Chromatogr., **148**, 335 (1978).
17. Fitzpatrick F. A., Siggia S. Anal. Chem., **45**, 2310 (1973).
18. Fitzpatrick F. A., Siggia S., Dingman J. Anal. Chem., **44**, 2211 (1972).
19. Lafosse M., Keravis G., Durand M. H. J. Chromatogr., **118**, 283 (1976).
20. Hunter I. R., Walden M. K., Heftmann E. J. Chromatogr., **176**, 485 (1976).
21. Voelter W., Kronbach T. неопубликованные результаты.
22. Huber J. F. K., Hulsman J. A. R. J. Chromatogr., **62**, 79 (1971).
23. Butterfield A. G., Lodge B. A., Pound N. J. J. Chromatogr. Sci., **11**, 401 (1973).
24. Maysinger D., Marcus C. S., Wolf W., Tarle M., Casanova J. J. Chromatogr., **130**, 129 (1977).
25. Dolphin R. J. J. Chromatogr., **83**, 421 (1973).
26. Lin J.-T., Heftmann E. J. Chromatogr., **212**, 239 (1981).
27. Dolphin R. J., Pergande P. J. J. Chromatogr., **143**, 267 (1977).
28. Fukuchi H., Tsukiai S., Inoue M. Yakuzai-gaku, **38**, 102 (1978).
29. Keravis G., Lafosse M., Durand M. H. Chromatographia, **10**, 678 (1977).
30. Helboe P., Thomsen M. Arch. Phar. Chemi. Sci. Ed., **6**, 397 (1978).
31. Bagon K. R., Hammond E. W. Analyst (London), **103**, 156 (1978).
32. Krzeminski L. F., Cox B. L., Dunn G. H. III, J. Agr. Food Chem., **26**, 891 (1978).
33. Van der Wal S., Huber J. F. K. J. Chromatogr., **135**, 305 (1977).
34. Musey P. I., Collins D. C., Preedy J. R., Steroids, **31**, 583 (1978).
35. Fransson B., Wahlund K.-G., Johansson I. M., Schill G. J. Chromatogr., **125**, 327 (1976).
36. Hermansson J. J. Chromatogr., **152**, 437 (1978).
37. Van der Wal S., Huber J. F. K. J. Chromatogr., **149**, 431 (1978).
38. Bauer H., Voelter W., Chap. 8 of this monograph.
39. Lin J.-T., Heftmann E., Hunter I. R. J. Chromatogr., **190**, 169 (1980).
40. Allenmark S., von Berg A. A., Hammar M., Lindström E. J. Chromatogr., **224**, 399 (1981).
41. Walters D. G., Foster P. M. D., Cottrell R. C. J. Chromatogr., **219**, 152 (1981).
42. Touchstone J. C., Wortmann W. J. Chromatogr., **76**, 224 (1973).
43. Matsuzawa T., Kato M., Sekiguchi M., Ishiguro I. Rinsho Kugaku, **5**, 239 (1977).

44. de Vries C. P., Popp-Shijders C., de Kieviet W., Akkerman-Faber A. C. *J. Chromatogr.*, **143**, 624 (1977).
45. Schwedt G., Bussemas H. H., Lippmann Ch. *J. Chromatogr.*, **143**, 259 (1977).
46. Gaetani E., Laureri C. F. *Farmaco Ed. Prat.*, **29**, 110 (1974).
47. Hesse C., Pietrizik K., Hötzel D., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **12**, 193 (1974).
48. Trejz F. K., Byrd D. J., Kochen W. *J. Chromatogr.*, **107**, 181 (1975).
49. Matsunaga T., Nagoya Shiritsu Daigaku Igakkai Zasshi, **26**, 330 (1975).
50. Frolov I. I., Vorobyeva R. G., Mironova I. V., Chernov A. Z., Yashin Ya. I. *J. Chromatogr.*, **80**, 167 (1973).
51. Mollica J. A., Strusz R. F., *J. Pharm. Sci.*, **61**, 444 (1972).
52. Landgraf W. C., Jennings E. C. *J. Pharm. Sci.*, **62**, 278 (1973).
53. Wikby A., Thalén A., Oresten G. *J. Chromatogr.*, **157**, 65 (1978).
54. Olson M. C. *J. Pharm. Sci.*, **62**, 2001 (1973).
55. King R. H., Grady L. T., Reamer J. T. *J. Pharm. Sci.*, **63**, 1591 (1974).
56. Butler J., Fantl V., Lim C. K., in: Dixon P. F., Gray C. H., Lim C. K. (Eds.): *High-Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry*, Proc. of Symposium 1975, Academic Press, London, 1976, p. 59.
57. Garg D. C., Ayres J. W., Wagner J. G. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **18**, 137 (1977).
58. Van den Berg J. H., Mol C. R., Deelder R. S., Thijssen J. H. *Clin. Chim. Acta*, **78**, 165 (1977).
59. Tymes N. W. *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 151 (1977).
60. Gordon G., Wood P. R. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **14**, 30 (1977).
61. Gallant S., Bruckheimer S. M., Brownie A. C. *Anal. Biochem.*, **89**, 196 (1978).
62. Das Gupta V., Ghanekar A. G. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 889 (1978).
63. O'Hare M. J., Nice E. C., Magee-Brown R., Bullmann H. *J. Chromatogr.*, **125**, 357 (1976).
64. Wortmann W., Schnabel C., Touchstone J. C. *J. Chromatogr.*, **84**, 396 (1973).
65. Hara S., Hayashi S. *J. Chromatogr.*, **142**, 689 (1977).
66. Scott N. R., Dixon P. F. *J. Chromatogr.*, **164**, 29 (1979).
67. Rose J. Q., Jusko W. J. *J. Chromatogr.*, **162**, 273 (1979).
68. Schöneshöfer M., Ducle H. J. *J. Chromatogr.*, **164**, 17 (1979).
69. De Vries C. P., Lomecky-Janousek M., Popp-Shijders C. *J. Chromatogr.*, **183**, 87 (1980).
70. Ballerini R., Chinol M. *J. Chromatogr.*, **193**, 413 (1980).
71. Schöneshöfer M., Skoboto R., Dulce H. J. *J. Chromatogr.*, **222**, 478 (1981).
72. Cochran R. C., Darney K. J. Jr., Ewing L. L. *J. Chromatogr.*, **173**, 349 (1979).
73. Slikker W. Jr., Lipe G. W., Newport G. D. *J. Chromatogr.*, **224**, 205 (1981).
74. De Ridder J. J., Koppens P. C. J. M., van Hal H. J. M. *J. Chromatogr.*, **143**, 281 (1977).
75. Loo J. C. K., Butterfield A. G., Moffatt J., Jordan N. J. *J. Chromatogr.*, **143**, 275 (1977).
76. Petersen M. C., Nation R. L., Ashley J. J. *J. Chromatogr.*, **183**, 131 (1980).
77. Loo J. C. K., Jordan N. J. *J. Chromatogr.*, **143**, 314 (1977).
78. Tsuei S. E., Ashley J. J., Moore R. C., McBride W. G. *J. Chromatogr.*, **145**, 213 (1978).
79. Higgins J. W. *J. Chromatogr.*, **115**, 232 (1975).
80. Wang D., Chung P., Lai J. *T'ai-wan Yao Hsueh Tsa Chin*, **28**, 11 (1977).
81. Mueller K. H., Stuber B. *Pharm. Acta. Helv.*, **53**, 124 (1978).
82. Smith M. D., Hoffman D. J. *J. Chromatogr.*, **168**, 163 (1979).
83. Gordon G., Wood P. R. *Analyst (London)*, **101**, 876 (1976).
84. Abdou H. M., Ast T. M., Cioffi F. J. *J. Pharm. Sci.*, **67**, 1397 (1978).
85. Görög S., Herényi B. *J. Chromatogr.*, **152**, 240 (1978).
86. Burgess C. *J. Chromatogr.*, **149**, 233 (1978).
87. Dekker D., Beijnen J. H., *J. Chromatogr.*, **193**, 480 (1980).
88. Carignan G., Lodge B. A., Skakum W. *J. Chromatogr.*, **206**, 174 (1981).

Витамины

Т. Кронбах, В. Вёльтер
(*Th. Kronbach, W. Voelter*)

12.1. Жирорастворимые витамины А, D, Е и К

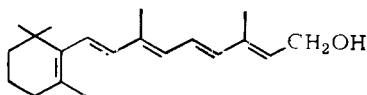
Биологические методы определения некоторых витаминов отличаются высокой чувствительностью и могут использоваться для исследования образцов с незначительным содержанием этих соединений. Однако точность таких методов невелика, кроме того, они требуют больших затрат времени и поэтому неудобны для проведения рутинных анализов.

Физические и химические методы, как правило, требуют меньше времени и дают более воспроизводимые результаты. Для количественного анализа используют обычно колориметрию, спектрофотометрию или флуориметрию. Перед проведением этих анализов мешающие определению соединения необходимо удалить, что не всегда осуществимо. Например, анализ содержания провитамина А в томатах дает завышенные результаты вследствие высокого содержания в этих овощах ликопена, совершенно не обладающего биологической активностью [1]. В отдельных случаях для определения витаминов прибегают к ГЖХ, однако этот метод не получил широкого распространения из-за термической нестойкости таких витаминов, как, например, А и D.

Разделение методом жидкостной хроматографии можно проводить и при обычной температуре, причем необходимая предварительная очистка образца весьма проста. В результате колоночная хроматография широко применяется как метод подготовки проб, а ВЭЖХ с появлением стабильных и эффективных колонок и чувствительных детекторов стала наиболее быстрым и точным методом анализа жирорастворимых витаминов, их эфиров, изомеров и других родственных соединений.

12.1.1. Витамин А (ретинол)

Соединения группы витамина А относятся к каротиноидам и имеют следующую структуру:



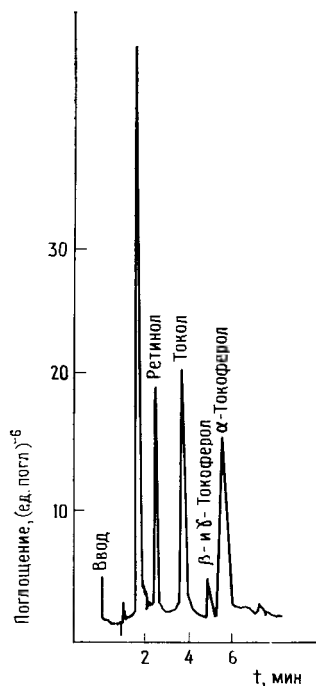


Рис. 12.1. Разделение на обращенной фазе ретинола, токоферола и токола (внутренний стандарт) экстракта сыворотки крови [10].

Колонка: 250×4,6 мм; неподвижная фаза: RSIL-C₁₈ (10 мкм); элюент: метанол; объемная скорость: 2 мл/мин; температура: 40 °С; обнаружение: УФ-детектор, 292 нм.

Важнейшее соединение этой группы ретинол ($\lambda_{\text{макс}}=325$ нм, $\epsilon=5200$ [2]) участвует в биохимических процессах в спиртовой, альдегидной и эфирной формах, а также в виде своего производного родопсина (ретипаль, связанный с опсином через основание Шиффа). Соединения группы витамина А чувствительны к воздействию света и тепла и легко окисляются, что затрудняет работу с ними. Подготовку проб к анализу следует проводить очень тщательно. Поскольку ретинол — наиболее липофильный витамин, мешающие определению липидные материалы необходимо удалить перед анализом омылением и (или) осаждением. Эти операции, однако, требуют много времени, или же их необходимо проводить при повышенной температуре.

Вильямс и др. [3] показали, что ГПХ — прекрасный метод определения ретинола в жире печени трески, делающий ненужной стадию предварительной химической обработки исследуемой пробы. ГПХ была использована также для разделения и идентификации метаболитов ретинола в слизистой оболочке кишок [4].

При исследовании ретинола используются два следующих подхода (табл. 12.1): осуществляется обнаружение различных соединений группы витамина А либо одновременное обнаружение смесей витаминов. В первом случае предпочтение следует

Таблица 12.1. Примеры применения ВЭЖХ для выделения полностью *транс*-ретинола

Исследуемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
Полностью <i>транс</i> -ретинол, 13- <i>цис</i> -ретинол	О	Метанол/10 мМ ацетат натрия (80 : 20)	Стандартные растворы	6
11- <i>цис</i> -, 13- <i>цис</i> -, 9- <i>цис</i> -Ретинолы, полностью <i>транс</i> -ретинол	Н	5% диоксана в <i>n</i> -гексане	Зрительные пигменты	6
13- <i>цис</i> -Ретиноевая кислота, полностью <i>транс</i> -ретинол, полностью <i>транс</i> -ретинилацетат	О	1% ацетата аммония в смеси H ₂ O/ацетонитрил (20 : 80)	Плазма	7
Витамины К, D ₂ , Е, А, витаминов А и Е ацетаты	О	H ₂ O/метанол (градиентное элюирование)	Стандартные растворы	3
Различные эфиры ретинола	О	Метанол с различным содержанием ионов серебра	Сыворотка крови и изучение хроматографических проблем	8
Ретиноевая кислота, ренол, ретинилпальмитат	О	10 мМ ацетат натрия в смеси H ₂ O/метанол (20 : 80)	Стандартные растворы	4,5
Витаминов А и Е ацетаты, витамин D ₂	О	H ₂ O/метанол (1 : 9)	Поливитаминовые таблетки	9
Пирен (внутренний стандарт), витамины D ₂ и А, ацетат витамина Е	О	H ₂ O/метанол (градиентное элюирование)	Экстракт витаминных капсул	3
Ретинол, витамин Е	О	Метанол	Сыворотка крови	10
Витамины В ₁ , В ₁₂ , К ₃ , С, D ₂ , Е, А	О	H ₂ O/метанол (градиентное элюирование)	Стандартные растворы	11
Ретинол	О	Метанол/H ₂ O (92 : 8)	Жир печени трески после очистки ГПХ	3

^а Перечислены в порядке элюирования.

^б Н — нормальная фаза для ВЭЖХ на основе силикагеля; О — обращенная фаза для ВЭЖХ с химически привитыми октадецильными группами, носитель — стекло или силикагель.

Таблица 12.2. Примеры выделения при помощи ВЭЖХ полностью *транс*-ретиная

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
13-цис-, 11-цис-, 9-цис-ретинали, полностью <i>транс</i> -ретиная	H	5% диоксана в <i>n</i> -гексане	Экстракт на- ружных сег- ментов сет- чатой обо- лочка глаза, препаратив- ная ВЭЖХ	6
13-цис-, 11-цис-, 9-цис-, 7-цис-, полностью <i>транс</i> - ретинали	H	12% диэтило- вого эфира в <i>n</i> -гексане	Препаратив- ная ВЭЖХ изомеров ре- тиналя	12
13-цис-, 11-цис-, 9-цис-, полностью <i>транс</i> -ретина- ли	H		Зрительные пигменты	6
	CN-сили- кагель	1% диэтилово- го эфира в <i>n</i> -гексане		13
	H	12% диэтило- вого эфира в <i>n</i> -гексане	Влияние апро- тонных рас- творителей на <i>цис</i> — <i>транс</i> -изоме- ризацию	14
13-цис-, 11-цис-ретинали, 13-цис-, 11-цис-дегидро- ретинали, 9-цис-ретиная, 9-цис-дегидроретиная, 7-цис-ретиная, 7-цис-де- гидроретиная, полностью <i>транс</i> -ретиная, полно- стью <i>транс</i> -дегидрорети- ная, <i>m</i> -нитробензальде- гид (внутренний стан- дарт)	H	6% диэтилово- го эфира в <i>n</i> -гексане	Фотоизомери- зация рети- налей и де- гидроретина- лей	15

^а Перечислены в порядке элюирования. ^б То же, что и в табл. 12.1.

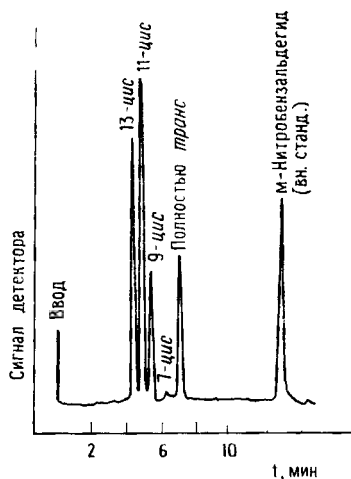
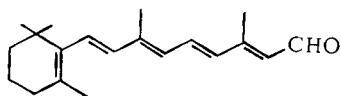


Рис. 12.2. Разделение изомеров ретиналя [15].

Колонка: 300×4 мм; неподвижная фаза: и-порасил; элюент: 12%-ный диэтиловый эфир в *n*-гексане; давление: 3,4 МПа, температура: комнатная; обнаружение: УФ-детектор, 254 нм.

отдать адсорбционной хроматографии, позволяющей наиболее эффективно осуществлять разделение соединений, близких по своим свойствам, например изомеров. Во втором случае следует прибегнуть к обращенно-фазовой ВЭЖХ, поскольку разделяемые соединения значительно отличаются по полярности (рис. 12.1).

Предпочтительность адсорбционной хроматографии для разделения изомеров иллюстрирует также табл. 12.2, в которой представлены данные по разделению изомеров ретиналя. Все транс-ретинали имеют следующую структуру:



Среди всех производных витамина А только ретиналь проявляет биологическую активность, находясь в *цис*-форме. С появлением ВЭЖХ значительно интенсифицировались исследования *цис*—*транс*-ретиналей в биологических объектах, а также очистка *цис*—*транс*-изомеров (рис. 12.2).

В табл. 12.3 и 12.4 приведены данные по применению ВЭЖХ для разделения полностью *транс*-ретиновых кислот и ретиниловых эфиров. Разделение этих соединений используют в процессах синтеза и контроля, для структурных исследований, для их определения в биологических объектах.

12.1.2. Витамин D и родственные соединения

Проблема аналитического определения витамина D имеет два аспекта. Первый связан с разделением витамина D и других жирорастворимых витаминов или изомеров витамина D с

Таблица 12.3. Пример выделения при помощи ВЭЖХ полностью транс-ретиновой кислоты

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
13-цис-Ретиновая кислота	O	10 mM ацетат натрия/метанол (25 : 75)	Стандартные растворы	5
4-Кеторетиновая кислота, 4-гидроксиретиновая кислота	O	10 mM ацетат натрия/метанол (35 : 65)	Стандартные растворы	5
Ароматические ретиноиды	H	<i>n</i> -Гексан-ТГФ-уксусная кислота (98 : 1,5 : 0,6) или <i>n</i> -гексан/метилбензоат/пропионовая кислота (87,5 : 12,5 : 0,35)	Плазма	
Аналоги ароматической ретиновой кислоты	H	Дихлорметан/метанол (99,5 : 0,5)	Биологические жидкости	17
5,6-Эпоксиретиновая кислота	O	10 mM ацетат аммония/H ₂ O (60 : 40)	Метаболиты витамина А в тканях после ГПХ	4

^а Перечислены в порядке элюирования. ^б То же, что и в табл. 12.1.

целью определения содержания витамина в различных пищевых продуктах, кормах, биологических объектах. Вторым аспектом является исследование метаболизма витаминов D₂ и D₃ (в данном случае неясна роль некоторых малоактивных метаболитов).

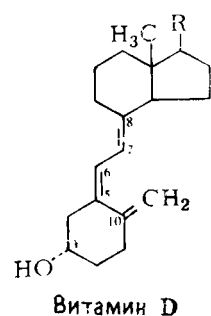
Групповое разделение жирорастворимых витаминов осуществлялось как на нормальной, так и на обращенной фазах. В одной из ранних работ разделение витамина D₃, провитамина D₃ и некоторых производных витамина А проводилось на неподвижной фазе видак [23]. Томкинс и Шерне [21] предложили использовать в качестве неподвижной фазы зорбакс Sil, а в качестве элюента — смесь гексан/дихлорметан/этилацетат (84 : 12 : 4) для отделения ацетата витамина А, витамина D₂ и *n*-нитрофенилацетонитрила (внутренний стандарт) от защищенной желатиной смеси ацетата витамина А и витамина D₂. При использовании в качестве неподвижной фазы μ -порасила и смеси хлороформ/тетрагидрофуран (70 : 3 : 1) в качестве элюента элюирование происходило в следующем порядке (рис. 12.4):

Таблица 12.4. Примеры разделения ретиниловых эфиров при помощи ВЭЖХ

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
Полностью <i>транс</i> -ретинил-ацетат и 10 изомеров	O	Метанол/Н ₂ O (90 : 10)	¹ H-ЯМР изомеров для установления структуры	18
Ретинилацетат, витамин D ₂ , витамина Е ацетат	O	Метанол/Н ₂ O (98 : 2)	Поливитаминовые таблетки	19
Метилретиноат, метил-4-гидроксиретиноат, метил-4-кеторетиноат	H	ТГФ/ <i>n</i> -гексан (7,5 : 92,5)	Стандартные растворы	5
Метил-4-кеторетиноат, метилретиноат	O	Метанол/Н ₂ O (85 : 15)	Стандартные растворы	5
Витаминов А и Е ацетаты*, витамин D ₂	H	1,25% изопропанола в циклогексане	Поливитаминовые таблетки	9
Этилбензоат (внутренний стандарт), 13- <i>цис</i> -ретинилацетат, полностью <i>транс</i> -ретинилацетат	H	0,1% диоксана в <i>n</i> -гексане	Синтез и контроль продуктов	20
Нафталин (внутренний стандарт), 13- <i>цис</i> -, 9- <i>цис</i> -, полностью <i>транс</i> -ретинил-ацетаты	Al ₂ O ₃	1% диэтилового эфира в <i>n</i> -гексане	Синтез и контроль продуктов	20
Ретинилацетат, витамин D ₂ , сукцинат витамина Е	Зипакс НСР	Метанол/0,1% Н ₃ РO ₄ в Н ₂ O (77 : 23)	Экстракт витаминных таблеток	3
11- <i>цис</i> -, 9- <i>цис</i> -, полностью <i>транс</i> -ретинилпальмитаты	H	0,1% диоксана в <i>n</i> -гексане	Ретинальный пигмент эпителия	6
Ретинилпальмитат	O	Изопропанол/Н ₂ O (85 : 15)	Стандартные растворы	3

^а Перечислены в порядке элюирования. Звездочка означает, что разделение происходит неполностью. ^б То же, что и в табл. 12.1.

2-*n*-диметиламинобензальдегид (внутренний стандарт), тахистерол₃ и витамин D₃ [22]. Авторы работы [3] разделили хризен (внутренний стандарт), ацетат витамина А, витамин D₂ и сукцинат витамина Е на колонке с зипаксом-НСР при элюировании смесью метанол/вода (77 : 23) плюс 0,14% фосфорной кислоты. Эти же авторы [11] использовали обращенно-фазовую хроматографию (неподвижная фаза — пермафаза ODS) и градиентное элюирование от воды до метанола (5%/мин) для разделения витамина К, ацетата витамина А, витамина D₂, витамина Е, ацетата витамина Е и витамина А, а также витаминов В₂, В₁₂, К₃, С, D₂, Е и А (в последнем случае концентрация



Витамин D₂ R =

Витамин D₃ R =

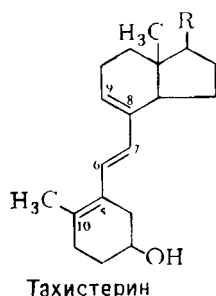
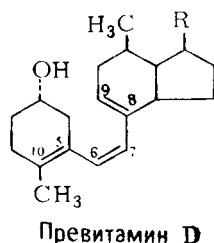


Рис. 12.3. Структура витамина D и его производных.

Метаболиты витамина D: 25-гидроксивитамин D (25-OH-D); 1,25-дигидроксивитамин D (1,25-(OH)₂-D); 24,25-дигидроксивитамин D (24,25-(OH)₂-D); 25,26-дигидроксивитамин D (25,26-(OH)₂-D); 1,24,25-тригидроксивитамин D (1,24,25-(OH)₃-D).

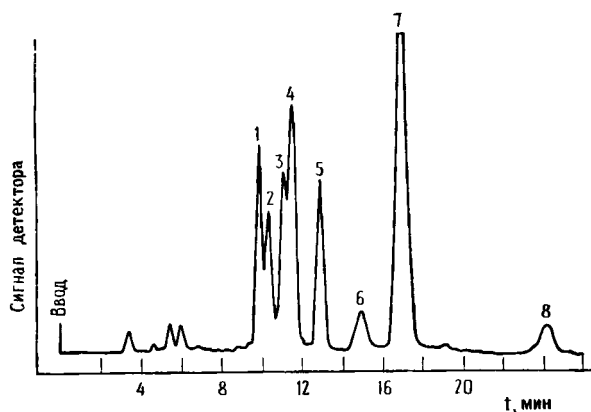


Рис. 12.4. Разделение на нормальной фазе синтетической смеси продуктов фотоизомеризации и продуктов реакции витамина D₃ и внутреннего стандарта (*p*-диметиламинобензальдегида) [22].

Колонка: 300×4 мм; неподвижная фаза: μ -порасил; элюент: хлороформ/*n*-гексан/тетрагидрофуран (70 : 30 : 1); объемная скорость: 1 мл/мин; температура: комнатная; обнаружение: УФ-детектор, 254 нм.

1 — *транс*-D₃; 2 — *пре*-D₃; 3 — люмистерин; 4 — изотахистерин; 5 — внутренний стандарт; 6 — тахистерин; 7 — витамин D₃; 8 — 7-дегидрохолестерин.

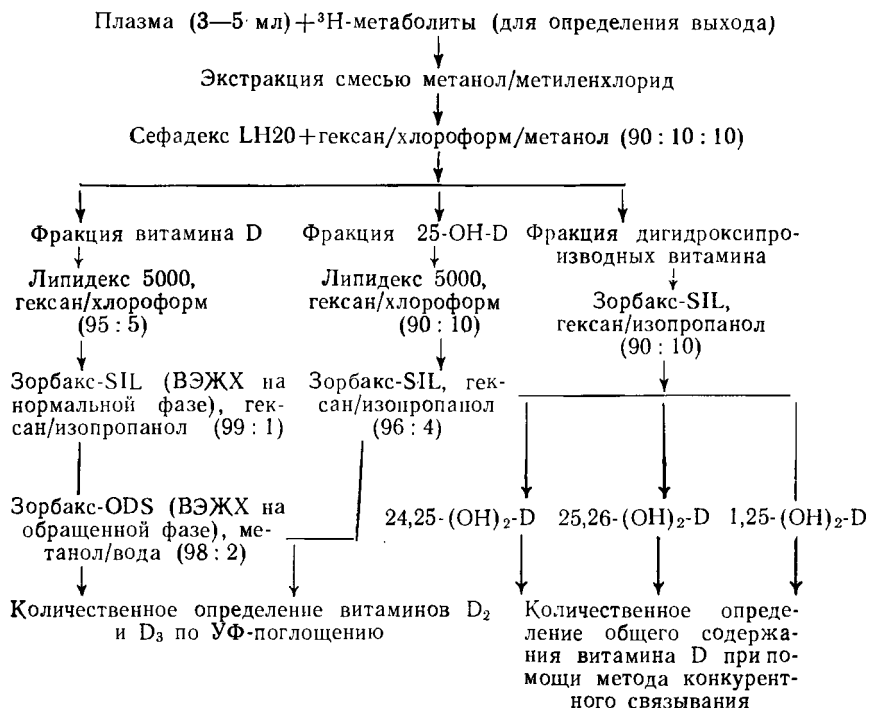


Рис. 12.5. Схема многоступенчатого определения метаболитов витамина D [47].

метанола повышалась со скоростью 3%/мин). Авторы работы [19] определяли ацетат витамина А, витамин D $_2$ и ацетат витамина Е в таблетках сложного состава путем хроматографического разделения на обращенной фазе C $_{18}$ при элюировании метанолом с 2% воды. Бернс и Маккей [9] сравнили результаты определения жирорастворимых витаминов в поливитаминных таблетках, проведенного методами обращенно-фазовой и адсорбционной хроматографии, и рекомендуют объединять эти два метода для разделения витамина А, ацетата витамина А, витаминов D $_2$ и Е и ацетата витамина А.

В табл. 12.5 приведены условия разделения методом ВЭЖХ витамина D и его структурных аналогов, исключая метаболиты витамина D, условия разделения которых будут приведены ниже.

Витамин D $_3$ гидроксилируется в печени до 25-OH-D $_3$ и в почках до 1,25-(OH) $_2$ -D $_3$ (см. рис. 12.3) и в этой форме включается в механизм кишечного поглощения кальция и фосфора и в их мобилизацию из костей. Идентифицирован также ряд других метаболитов витамина D $_3$: 24,25-(OH) $_2$ -D $_3$, 25,26-(OH) $_2$ -D $_3$ и 1,24,25-(OH) $_3$ -D $_3$, обладающих меньшей биологической актив-

Таблица 12.5. Примеры разделения при помощи ВЭЖХ соединений группы витамина D и соединений с близкой структурой

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^а	Элюент	Применение	Литература
D ₃	H	n-Гексан/изопропанол (99,5 : 0,5)	Кожа крысы	24
D ₃	H	Изооктан/изопропанол (99,5 : 0,5) — аналитический режим, хлороформ/изооктан/метанол (75 : 25 : 1) — препаративный режим	Ингредиенты пищи после очистки с помощью препаративной ВЭЖХ	25
D ₃	H	n-Гексан/хлороформ (70 : 30)	Корма	26
D ₂ и D ₃ *	O	Метанол/H ₂ O (95 : 5)	Стандартные растворы	27
D ₂ , D ₃	O	Метанол/H ₂ O (95 : 5) + различные количества нитрата серебра	Стандартные растворы	27
Пре-D ₂ , тахистерин, D ₂	H	Хлороформ/n-гексан ^б /осушенный n-гексан/ТГФ/уксусная кислота (60 : 15 : 25 : 1,5 : 0,4)	Исходные материалы и фармацевтические препараты	28
транс-D ₃ , пре-D ₃ , люмистерин ₃ , изотахистерин ₃ , тахистерин ₃ , D ₃ , 9,7-дегидрохолестерин	H	Хлороформ/n-гексан/ТГФ (70 : 30 : 1)	Контроль синтеза	22
Пре-D ₂ и пре-D ₃ *, люмистерин ₃ , D ₂ и D ₃ *, тахистерин ₃ , про-D ₂ и про-D ₃ *	H	Петролейный эфир/1,2-дихлорэтан/диоксан (90 : 8 : 2)	Исходные материалы и фармацевтические препараты	29
D ₂ и D ₃ *, пре-D ₂ и пре-D ₃ *, про-D ₂ и про-D ₃ *	H	n-Гексан/2-пропанол (96 : 4)	Рыбные продукты	30
Пре-D ₂ и пре-D ₃ *, люмистерин ₃ , D ₂ , D ₃ * и тахистерин*, про-D ₂ и про-D ₃ *	O	Метанол/H ₂ O (95 : 5)	Стандартные растворы	29
Пре-D ₂ и пре-D ₃ *, люмистерин ₃ , D ₂ , D ₃ * и тахистерин*, про-D ₂ и про-D ₃ *	H	Петролейный эфир/1,2-дихлорэтан/ТГФ (85 : 8 : 7)		
транс-D ₃ , изотахистерин, пре-D ₃ , тахистерин, D ₃ , люмистерин ₃ , 7-дегидрохолестерин	O	Ацетоннитрил/пропионитрил/H ₂ O (79 : 15 : 6)	Смоляные масла и водные дисперсии	31
цис-D ₃ , тахистерин ₃ , люмистерин ₃ , транс-D ₃ , пре-D ₃	H	Изооктан/этанол (99 : 1 : 0,9)	Смолы, масла	32

^а Перечислены в порядке их элюирования. Звездочка показывает, что разделение проходит неполностью. ^б То же, что и в табл. 12.1. ^б Насыщенный серебром.

ностью. Их биологическая функция пока недостаточно ясна. Методы разделения этих метаболитов приведены в обзорах [33—37]. Пути метаболизма витаминов D_2 и D_3 аналогичны. В табл. 12.6 суммированы данные, характеризующие возможности применения ВЭЖХ для исследований метаболизма витамина.

Из-за малой стойкости растворов витамина D предварительную обработку проб следует проводить очень осторожно, чтобы исключить возможность изомеризации или разложения. Обычно можно ограничиться ополаскиванием стеклянной посуды различными растворителями, однако в ряде случаев приходится прибегать к дезактивации поверхности силианизацией. Исследуемые биологические материалы предварительно фракционируют с тем, чтобы удалить избыточные побочные продукты, например белки и (или) липиды, а также повысить концентрацию соединений, представляющих интерес для исследователя. Обычно вначале проводят экстракцию органическими растворителями, затем предварительную хроматографическую очистку на колонках с сефадексом LH20 (см., например, [47, 99, 48]), гидроксиалкоксипропилсефадексом [49], целитом 545 (80%-ный водный метанол — неподвижная фаза и *n*-пентан — элюент) или силикагеле при низком (см., например, [45]) либо высоком давлении [51, 47]. Один из вариантов такой очистки показан на рис. 12.5 [47].

Определение в биологическом материале 1,25-(ОН) $_2$ -производного витамина D, обладающего наибольшей биологической активностью, затруднено из-за его низкой концентрации. Например, концентрация 25-ОН- и 24,25-(ОН) $_2$ -производных (метаболитов) витаминов D_2 и D_3 в нормальной плазме крови человека составляет обычно от 1 до 30 мкг/л, тогда как средняя концентрация 1,25-(ОН) $_2$ -D не превышает 31 нг/л [44]. В связи с тем что в тех случаях, когда используется спектрофотометрическое обнаружение, масса биологической пробы ограничена, проблема обнаружения стоит очень остро. В обычных условиях разделить витамины D_2 и D_3 не удастся ни на нормальной, ни на обращенной неподвижной фазах. Однако, если к неподвижной фазе добавляют ионы серебра, эти витамины образуют комплексы с различной полярностью, так что пики их на хроматограмме могут достигать нулевой линии [26]. К сожалению, этот метод был применен только для разделения собственно витаминов D_2 и D_3 , хотя, по-видимому, к нему можно прибегать и в других аналогичных ситуациях.

При проведении хроматографического разделения витаминов рекомендуется пользоваться внутренними стандартами с тем, чтобы можно было определить потери на стадии подготовки пробы. Внутренними стандартами помимо витаминов, меченных радиоактивными изотопами (см., например, [52, 47]),

Таблица 12.6. Применение ВЭЖХ для исследований метаболизма витамина D и его производных

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
D ₃ и многочисленные гидроксированные метаболиты (1, 24, 25)	H	Дихлорметан/метанол от 0,02 до 6%	Стандартные растворы	38
	H	Дихлорметан/метанол (98 : 2)	Стандартные растворы	38
25-OH-D ₂ , 25-OH-D ₃	H	n-Гексан/2-пропанол (97,5 : 2,5)	Плазма	39
1α-OH-D ₃	H	Петролейный эфир/дихлорэтан/ТГФ/n-пропанол (50 : 25 : 24 : 5)	Фармацевтические препараты	40
25-OH-D ₃	H	Петролейный эфир/дихлорэтан/ТГФ/n-пропанол (40 : 5 : 15 : 0,6)	Фармацевтические препараты	40
25-OH-пре-D ₃ , 25-OH-D ₃	H	Петролейный эфир/дихлорэтан/ТГФ/n-пропанол (40 : 5 : 15 : 0,6)	Стандартные растворы	40
1α-OH-D ₃ , 1α-OH-пре-D ₃	H	Петролейный эфир/дихлорэтан/ТГФ/n-пропанол (50 : 25 : 24 : 5)	Стандартные растворы	40
D ₂ и D ₃ *, 24-OH-D ₂ , 24-OH-D ₃ , 25-OH-D ₂ , 25-OH-D ₃	H	Скеллизоль В/2-пропанол (97 : 5 : 2,5)	Стандартные растворы	41
D ₂ , D ₃ , 25-OH-D ₂ , 25-OH-D ₃	H и O, объединенный метод	n-Гексан/2-пропанол (94,5 : 5,5) + +нормальная фаза, метанол/H ₂ O (различные отношения) + +обращенная фаза	Плазма	42
25-OH-D ₂	Различные H и O, объединенный метод	n-Гексан/2-пропанол (94,5 : 5,5) +нормальная фаза, метанол/2-пропанол/H ₂ O (70 : 18 : 12) +обращенная фаза	Полупрепаративное выделение и очистка 25-OH-D ₂ из плазмы	43
25-OH-D ₃	H (препаративная ВЭЖХ) O (аналитическая ВЭЖХ)	n-Гексан/2-пропанол (94,5 : 5,5) +нормальная фаза, метанол/2-пропанол/H ₂ O (70 : 18 : 12) + +обращенная фаза	Исследование плазмы по сле очистки препаративной ВЭЖХ	44

Разделяемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
25-ОН-D ₃ , 24,25-(ОН) ₂ -D ₃ , 25,26-(ОН) ₂ -D ₃ , 1α,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	Дихлорметан/ метанол (97 : 3)	Плазма	45
25-ОН-D ₃ , 1α-ОН-D ₃ , 1α,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	Петролейный эфир/дихлор- этан/ТГФ/ н-пропанол (50 : 25 : 24 : 5)	Стандартные растворы	40
D ₂ , 25-ОН-D ₂ , 24,25-(ОН) ₂ -D ₂ , 1α-ОН-D ₂ , 1,25-(ОН) ₂ -D ₂	H	Скеллизольв В/2- пропанол (90 : 10)	Плазма	41, 54
D ₃ , 25-ОН-D ₃ , 24,25-(ОН) ₂ -D ₃ , 1α-ОН-D ₃ , 25,26-(ОН) ₂ -D ₃ , 1,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	Скеллизольв В/2- пропанол (90 : 10)	Плазма	41, 54
25-ОН-D ₂ , 25-ОН-D ₃ , 24,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	н-Гексан/этанол (95 : 5)	Сыворотка	46
1α,25-(ОН) ₂ -D ₃ , 25-ОН-D ₃ , 1α-ОН-D ₃	O	94% этанол/H ₂ O (80 : 20)	Стандартные растворы	40
1α,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	Петролейный эфир/дихлор- этан/ТГФ/ н-пропанол (50 : 25 : 24 : 5)	Стандартные растворы	40
24-S,25-(ОН) ₂ -D ₃ - три-ТМС, 24-R,25- (ОН) ₂ -D ₃ -три-ТМС	H	н-Гексан/дихлор- метан (98 : 2)	Стандартные растворы	38
1α,25-(ОН) ₂ -D ₃ , 1α,25-(ОН) ₂ -пре-D ₃	H	Петролейный эфир/дихлор- этан/ТГФ/ н-пропанол (50 : 25 : 24 : 5)	Стандартные растворы	40
24,25-(ОН) ₂ -D ₂ , 24,25-(ОН) ₂ -D ₃	H	Скеллизольв В/2- пропанол (90 : 10)	Плазма	41, 54
1α,24R,25-(ОН) ₃ -D ₃ , 1α,24S,25-(ОН) ₃ -D ₃	H	Дихлорметан/ метанол (96,5 : 3,5)	Стандартные растворы	38

^а Перечислены в порядке элюирования. Звездочка показывает, что разделение прошло неполностью. ^б То же, что и в табл. 12.1.

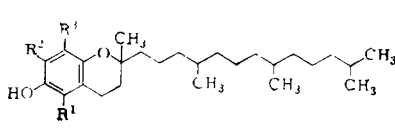
могут служить многие другие соединения, например прогестерон [28], *n*-крезол, α -нафтол [53] и *n*-нитрофенилацетонитрил [21].

12.1.3. Витамин Е (токоферолы и токотриенолы)

К числу соединений, входящих в группу витамина Е, относятся восемь в различной степени биологически активных α -, β -, γ - и δ -токоферолов и их производных — соответствующих токотриенолов (содержащих три ненасыщенные связи в углеводородной цепи).

Структура различных токоферолов показана в табл. 12.7.

Таблица 12.7. Структура токоферолов

Соединение	Структура		
			
α -Токоферол	R ¹ CH ₃	R ² CH ₃	R ³ CH ₃
β -Токоферол	CH ₃	H	CH ₃
γ -Токоферол	H	CH ₃	CH ₃
δ -Токоферол	H	H	CH ₃
Токоферол	H	H	H

Наибольшей биологической активностью отличается α -токоферол, коэффициент молярного поглощения α -токоферола относительно мал ($\lambda_{\text{макс}} = 292$ нм, $\epsilon_{1\text{ см}}^1 = 72$ [55]), поэтому предел обнаружения этого соединения УФ-детектором хуже, чем пределы обнаружения других жирорастворимых витаминов. Если исходить из результатов, полученных авторами работы [56], то чувствительность обнаружения флуоресцентным детектором можно повысить примерно в 10 раз при длине волны возбуждающего излучения 290 нм.

В соответствии со спектром флуоресцентного возбуждения α -токоферола, приведенным в работе [57], если использовать для возбуждения длину волны 205 нм, то можно ожидать 20-кратного увеличения чувствительности.

Как следует из данных, приведенных в табл. 12.8, разделение соединений этой группы осуществляется методами обычной и обращенно-фазовой хроматографии. Для разделения на отдельные соединения в рамках именно этой группы более прием-

Таблица 12.8. Примеры разделения токоферолов при помощи ВЭЖХ

Разделяемые соединения	Неподвижная фаза	Элюент	Применение	Литература
α -, β -, γ -, δ -Токоферолы	Силикагель	0,2% изопропанола или 5% диэтилового эфира в <i>n</i> -гексане	Пищевые продукты, ткани	56
α -, β -, γ -Токотриенолы	Силикагель	5% диэтилового эфира в гексане	Препаративная ВЭЖХ	56
Витамин А, токол, α -токоферол	Обращенная фаза C_{18}	Метанол	Сыворотка	10
α -, β -, γ -, α -Токоферолы, токол	Силикагель	<i>n</i> -Гексан/диизопропиловый эфир (92 : 8)	Сыворотка	58
α -, β -, γ -Токоферолы	Аминофаза	<i>n</i> -Гексан/изопропанол (98 : 2)	Сыворотка	58
α -, β -, γ -Токоферолы	Обращенная фаза C_{18}	Метанол/ H_2O (95 : 5)	Эритроциты	57
α -Токоферол	Обращенная фаза C_{18}	Метанол/ H_2O (97 : 3)	Плазма	59
α -Токоферол	Обращенная фаза C_{18}	Метанол	Сыворотка	60
Каротиноиды, витамин К, α -токоферилацетат	Силикагель	<i>n</i> -Гексан/диизопропиловый эфир (96 : 4)	Плазма	61
α -Токоферол	Обращенная фаза C_{18}	Метанол/ H_2O (95 : 5)	Корма	62
α -Токсиферилацетат, витамины А и D_2	Обращенная фаза C_{18}	Метанол/ H_2O (9 : 1)	Поливитаминовые таблетки	9
α -Токоферол, α -токоферилацетат, витамин А, витамина А ацетат, витамины D_2 и К	Обращенная фаза C_{18}	H_2O /метанол (градиентное элюирование)	Стандартные растворы	3
Витамины А, B_1 , B_{12} , K_3 , С, D_2 и Е	Обращенная фаза C_{18}	H_2O /метанол (градиентное элюирование)	Стандартные растворы	11
α -, β -, γ -, δ -Токоферолы	Различные нормальные и обращенные фазы	Различные	Стандартные растворы	63

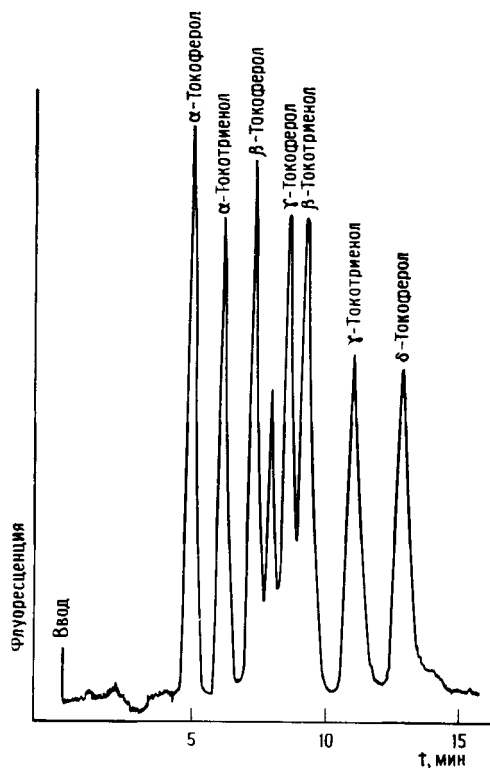


Рис. 12.6. Разделение соединений группы витамина Е [56].

Колонка: 250×3,2 мм; неподвижная фаза: лихросорб Si60 (5 мкм); элюент: 5%-ный диэтиловый эфир во влажном гексане; объемная скорость: 2 мл/мин; обнаружение: по флуоресценции, длина волны возбуждения 290 нм, испускаемая 330 нм.

лема хроматография на нормальных фазах [56], тогда как для отделения α -токоферола от других соединений этой группы более пригодна обращенно-фазовая ВЭЖХ, особенно при градиентном элюировании (рис. 12.6).

12.1.4. Витамин К

Витамин К (рис. 12.7) играет важную роль в образовании печенью протромбина и других белков, принимающих участие в процессах свертывания крови [64]. Поэтому очевиден возрастающий интерес к изучению метаболизма и биохимических функций витамина К. К сожалению, проблемы аналитического определения витамина К, его аналогов и метаболитов рассматриваются всего в нескольких публикациях.

Природный витамин K_1 имеет *транс*-конфигурацию, тогда как синтетические продукты содержат *цис*- и *транс*-изомеры [65, 66], поэтому изучению биологической активности этих изомеров

сипроизводных — с другой, необходимо несколько элюентов. Те же авторы установили, что ТСХ можно с успехом использовать для предварительной обработки пробы с целью удаления мешающих соединений из исходных липидных фракций [74]. Авторы работы [80] объединили адсорбционную и обращенно-фазовую ВЭЖХ с тем, чтобы исключить стадию предварительной очистки и сохранить уровень витамина K_1 в сыворотке крови. После удаления белков сыворотку экстрагируют *n*-гексаном, экстракт упаривают досуха, остаток растворяют в элюенте для ВЭЖХ и разделяют на силикагеле, элюируя 0,2%-ным ацетонитрилом в *n*-гексане. В результате такого предварительного фракционирования получают три фракции, одну из которых, содержащую витамин K_1 , собирают, упаривают, растворяют далее в элюенте для последующего разделения на обращенной фазе (неподвижная фаза ODS, элюент — 8%-ный раствор дихлорметана в ацетонитриле). Выход после экстракции превышает 90%, общий выход 60—89% при использовании витамина *транс*- 3H - K_1 в качестве внутреннего стандарта. На неподвижной фазе с привитыми CN-группами наблюдают следующий порядок элюирования: витамин K_1 , эпокси- K_1 , МК-4 и МК-9 (неподвижная фаза — RSilCN, элюент — 0,05%-ный раствор ацетонитрила в *n*-гексане). Ацетонитрил предпочтительнее дихлорметана, поскольку увеличивает селективность разделения. Физиологический уровень витамина K_1 в сыворотке крови, как известно, составляет 5—30 нг/мл, а предел обнаружения метода равен 500 пг/мл, следовательно, ВЭЖХ вполне пригодна для определения витамина К в биологических жидкостях.

12.2. Водорастворимые витамины

Для разделения и количественного определения водорастворимых витаминов можно применять самые различные хроматографические методики, поскольку молекулы этих соединений содержат ионогенные группы. Однако исследования водорастворимых витаминов с привлечением адсорбционной ВЭЖХ проводятся довольно редко, в то время как для работ, посвященных изучению жирорастворимых витаминов, характерно обратное. Изучение витаминов первой группы осуществляется методами обращенно-фазовой, ионообменной и ион-парной хроматографии. На рис. 12.8 показана хроматограмма, полученная при разделении ряда водорастворимых витаминов при помощи обращенно-фазовой ВЭЖХ. Возможности обнаружения витаминов этой группы также значительно шире, поскольку можно прибегать к методам, основанным на наличии у соединений ионогенных групп. Так, в настоящее время в этих целях с успехом применяются электрохимические методы.

Каждый из этих методов имеет свои преимущества, и выбор зависит от конкретной задачи, стоящей перед исследователем. Поскольку при кислых или нейтральных значениях pH тиамин — это четвертичный амин, его хроматографическое поведение в значительной степени зависит от pH и ионной силы элюента. Это, в частности, показали авторы работы [84], которым удалось элюировать тиамин с катионообменной колонки, заполненной катионообменником зипакс SCX только при щелочных pH элюента (0,05 М NaH_2PO_4 при pH 9 и 0,8 М NaClO_4). Авторы работы [85] провели систематическое изучение удерживания водорастворимых витаминов, включая тиамин, при использовании различных методов ВЭЖХ: обращенно-фазовой (С-18), ион-парной (С-18) и ВЭЖХ на аминофазе. Во всех этих случаях время удерживания в значительной степени зависело от pH элюента. Водорастворимые витамины сильно различаются по полярности, поэтому во многих случаях их разделению способствует градиентное элюирование, как это показывают результаты работы [86].

В табл. 12.9 приведен исчерпывающий обзор работ, в которых рассматривается анализ тиамина при помощи ВЭЖХ с применением различных неподвижных фаз.

12.2.2. Витамин В₂ (рибофлавин)

Рибофлавин (рис. 12.10) обычно определяют флуоресцентными методами, сравнивая спектры флуоресценции исследуемой пробы в окисленном (флуоресцирующая форма) и восстановленном (лейкоформа) состояниях, чтобы определить содержание рибофлавина в пробе [94, 95]. Для определения рибофлавина в биологических жидкостях используется и ряд других методов: ТСХ [96], микробиологический [97] и протозоологический [98]. Для идентификации и определения содержания рибофлавина, как и других водорастворимых витаминов, пригодны различные методы ВЭЖХ. Вследствие возрастания потребности в определении общего содержания водорастворимых витаминов в фармацевтических препаратах широкое распространение получили методы группового отделения этих соединений (некоторые из них указаны в табл. 12.9). Авторы работы [99] описали проведенное Юрандом [100] разделение на колонке с силакателем с привитыми короткоцепочечными алкильными группами смеси, состоящей из кофеина и витаминов В₂, В₃ и В₆, при элюировании смесью метанол/вода/аммиак (85:15:25), содержащей 0,1% лаурилсульфата натрия. Длительность разделения составляет менее 10 мин, пики всех соединений достигают нулевой линии.

Рибофлавин, аминокислоты, витамины В₆, С и ниацинамид были разделены на аминофазе [101]. Эту смесь можно разде-

Таблица 12.9. Методы разделения соединений группы витамина В при помощи ВЭЖХ

Исследуемые соединения	Неподвижная фаза	Элюент	Применение	Литература
Ниацин, витамины В ₂ и В ₆ , фолиевая кислота, витамин В ₁	—NH ₂ ^a	1 мМ NaH ₂ PO ₄ /ацетонитрил (80 : 20)	Фармацевтические препараты	86
Витамин С, фолиевая кислота, витамин В ₆ , ниацин, витамин В ₁ , В ₂	С-8 ^b	А: 1% (NH ₄) ₂ CO ₃ , Б: метанол; градиент от А до Б, 4%/мин	Фармацевтические препараты	86
Ниацин, витамин В ₆ , В ₁ , В ₂ , С, фолиевая кислота	С-2 ^b	А: 0,5% гексадецилтриметиламмонийбромид, Б: метанол; градиент от 5 до 60% Б, 3%/мин	Фармацевтические препараты	86
Ниацин, ниацинамид, пиридоксин, тиамин, рибофлавин	С-18 ^c	5 мМ гексамультавитаминный сульфат натрия в смеси 1%-ная уксусная кислота/метанол (75 : 25)	Поливитаминные препараты	87
Аскорбиновая кислота, ниацин, пиридоксин, ниацинамид, тиамин	С-18 ^c	0,5 М Li ₂ SO ₄ в смеси метанол/Н ₂ О (5 : 95)	Стандартные растворы	88
Витамин В ₆ , ниацинамид, фосфат витамина В ₂ , метагин, пропагин, тиамин	Сильный катионообменник	0,1 М фосфатный буфер (рН 8)	Экстракты таблеток, используемые в ветеринарии	89
Тиамин-НСI, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиаминтрифосфат	Анионообменник	А: 1 мМ КН ₂ РО ₄ (рН 6,0), Б: 0,5 М КН ₂ РО ₄ (рН 6,0); градиент от 0 до 70% Б после 4 мин при 5% Б/мин	Стандартные растворы	90

Окситиамин, тиамин	C-18 ^б (ИПХ)	H ₂ O/метанол (3 : 1) плюс 1%-ная уксусная кислота и 1 мМ гептансульфоновая кислота	Стандартные растворы	90
Тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат	C-18 ^б (ИПХ)	50 мМ тетрабутиламмоний-гидроксид и 1%-ная уксусная кислота (pH 4,3)	Стандартные растворы	90
Тиамин в виде тиохрома	П ^а	Метанол/диэтиловый эфир (22 : 88)	Моча	91
Аскорбиновая кислота, ниацин, ниацинамид, фолиевая кислота, тиамин, рибофлавин, витамин B ₁₂	C-18 ^б (ИПХ)	Тетрабутиламмонийфосфат в смеси H ₂ O/метанол (70 : 30)	Стандартные растворы	85
Аскорбиновая кислота, ниацин, фолиевая кислота, пиридоксин, рибофлавин, витамин B ₁₂ , ниацинамид, тиамин	Различные: обращенная, аминофаза, обращенная для ИПХ	H ₂ O/метанол с добавками солей или ИПХ-реагентов	Систематический анализ водорастворимых витаминов	85
Тиамин	Сильный катионообменник	50 мМ Na ₂ HPO ₄ (pH 9), 0,8 М NaClO ₄	Экстракты таблеток	84
Тиамин, рибофлавин, ниацин	Сильный анионообменник	10 мМ NaNO ₃	Экстракты таблеток	84
Тиамин, тиаминмонофосфат, тиаминдифосфат, тиаминтрифосфат	—NH ₂ ^а	90 мМ калий-фосфатный буфер (pH 8,4)/ацетонитрил (40 : 60)	Ткани крысы	93

^а Аминофаза. ^б Обращенная фаза для ВЭЖХ на носителе с химически привитыми алкильными группами, длина цепи указана. ^в Нормальная фаза для ВЭЖХ на силикагелевом носителе.

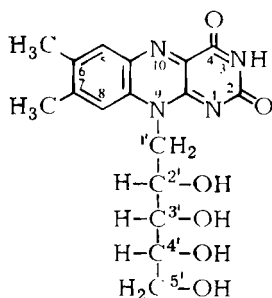


Рис. 12.10. Структура рибофлавина.

лить количественно менее чем за 30 мин при градиентном элюировании смесью ацетонитрил/фосфатный буфер.

Рибофлавин обнаруживается в моче человека только в свободном виде, что подтвердили исследования, проведенные методом ВЭЖХ [102—105]. Как показали последующие работы, применение ВЭЖХ для такого рода исследований позволяет получить более точную информацию, поскольку рибофлавин количественно отделяется от соединений, которые могут исказить результаты физико-химического анализа, основанного на применении флуоресцентного метода. ВЭЖХ — наиболее приемлемый метод рутинного определения рибофлавина в моче, поскольку подготовка пробы заключается только в ее центрифугировании, а длительность анализа составляет примерно 5 мин.

12.2.3. Витамин В₆ (пиридоксиновая группа)

Активностью витамина В₆ обладают шесть соединений пиридоксиновой группы — пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин и соответствующие им фосфаты (рис. 12.11); наиболее широкое применение в качестве лекарственной формы нашел пиридоксол.

Многие из ранних методов определения витамина В₆ в пищевых продуктах и биологических жидкостях трудоемки, дорогостоящи и недостаточно точны [106—109]. В то же время методы анализа, основанные на применении ВЭЖХ, требуют мало времени и отличаются точностью и селективностью. В настоя-



Рис. 12.11. Структура некоторых соединений группы витамина В₆.

щее время хроматографические методы позволяют определять все витамины группы В₆ при концентрациях, соответствующих их содержанию в плазме крови [110]. При групповом разделении витаминов В₆ или водорастворимых витаминов чаще всего осуществляется определение самого пиридоксола, поскольку именно с этой целью и анализируются фармацевтические препараты. Тем не менее фармакологические исследования и изучение метаболизма делают необходимым и определение различных отдельных соединений, входящих в эту группу. В табл. 12.10 приведен краткий обзор хроматографических методов, используемых для разделения различных соединений группы В₆. Другие методы, в частности методы группового разделения витаминов В, рассмотрены в работах [84, 85, 87—89].

12.2.4. Витамин С (аскорбиновая кислота)

Классические методы анализа витамина С — это титрование 2,6-дихлорфенолиндефенолом [116], микрофлуориметрия [117] и колориметрия 2,4-динитрофенилгидразоновых производных

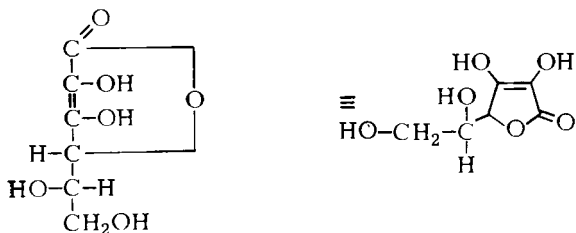


Рис. 12.12. Структура аскорбиновой кислоты.

дегидроаскорбиновой кислоты [118]. Применяются также и другие методы, например электрохимические [119, 120], турбидиметрические [121], газохроматографические [122]. Большинство из них трудоемки и имеют ограниченное применение, обусловленное присутствием (или отсутствием) в пробе ряда мешающих определению соединений. Именно это обстоятельство и стимулировало разработку соответствующих методов ВЭЖХ, включая ионообменную, ион-парную и обращенно-фазовую хроматографию.

Определение аскорбиновой кислоты осложняет присутствие в изучаемой пробе таких соединений, как, например, дегидроаскорбиновая кислота [126]. Поскольку эта кислота обладает биологической активностью, но очень слабо поглощает, то при проведении исследований *in vivo* ее следует учитывать, а при определении аскорбатов в пищевых продуктах или фармацев-

Таблица 12.10. Применение ВЭЖХ для исследований пиридоксина, пиридоксала и пиридоксамина

Исследуемые соединения ^а	Неподвижная фаза	Элюент	Применение	Литература
Пиридоксамнифосфат, пиридоксамин, пиридоксолфосфат, пиридоксол, пиридоксальфосфат, пиридоксаль	Аминекс А-25	0,4 М NaCl, 10 мМ глицин, 5 мМ семикарбазид, pH 10 (NaOH)	Таблетки и плазма крови	110
Пиридоксаминфосфат, пиридоксамин, пиридоксолфосфат, пиридоксол, 3-гидроксипиридин, пиридоксаль, пиридоксионовая кислота	Аминекс А-25	0,4 м NaCl, 10 мМ глицин, pH 10—2,5 (ступенчатый градиент)	Поливитаминовые препараты	111
Пиридоксаль, пиридоксамин	C-18	67 мМ KН ₂ РO ₄ , pH 2,6 (H ₃ РO ₄)	Плазма крови, моча, фармакокинетика	112
Пиридоксамин, пиридоксаль, пиридоксол	C-18	33 мМ KН ₂ РO ₄ , pH 2,2 (H ₃ РO ₄)/ацетонитрил (99 : 1)	Экстракты молока	113
Пиридоксаль, пиридоксол, пиридоксамин	Катионообменник (аминекс А-5)	0,7 М аммоний-формиатный буфер (изократический режим) или аммоний-формиатный буфер от 10 мМ (pH 6,5) до 1 М (pH 6,6) (градиентный режим)	Стандартные растворы	114
Пиридоксаль, пиридоксол, пиридоксамин	C-18 (ИПХ)	Гептансульфонат/2-пропанол	Стандартные растворы	114

^а Перечислены в порядке элюирования.

тических препаратах исключать. Более того, необходимо позаботиться, чтобы на стадии предварительной обработки пробы или в процессе ее хроматографического разделения отличающаяся сильным поглощением в УФ-области аскорбиновая кислота не окислилась до дегидроаскорбиновой, не поглощающей в этой области спектра.

Изоаскорбиновая кислота (D-аскорбиновая кислота) в природных продуктах не обнаружена. Ее биологическая активность в 20 раз ниже, чем у аскорбиновой кислоты, однако она дешевле, и поэтому ее используют в качестве добавок в пищевые продукты и соки. Автор работы [127] осуществил разделение изоаскорбиновой и аскорбиновой кислот на аминофазе при элюировании 75%-ным раствором ацетонитрила в 5 мМ KH_2PO_4 (рН 4,4—4,7), а также сумел определить содержание изоаскорбиновой кислоты в апельсиновом соке. В работе [84] описана методика определения состава апельсинового сока. Пробу сока хроматографировали на колонке с сильным анионообменником зипакс SAX, используя 5 мМ NaH_2PO_4 в качестве элюента.

Возможности применения хроматографического анализа для определения витамина С в фармацевтических препаратах и пищевых продуктах были изучены рядом исследователей. Авторы работы [85] разделили аскорбиновую кислоту, ниацин, ниацинамид, фолиевую кислоту, витамин B_{12} , рибофлавин и тиамин на колонке, заполненной μ -бондапаком C_{18} , элюентом служила смесь вода/метанол (70:30) с добавкой реагента А для ион-парной хроматографии. Те же авторы [85] разделили смесь, состоящую из пиридоксина, ниацинамида, рибофлавина, витамина B_{12} , аскорбиновой кислоты и ниацина на колонке с μ -бондапаком NH_2 при элюировании смесью 0,125%-ный цитрат/метанол (20:80). Вандемарк [86] изучил удерживание водорастворимых витаминов, включая аскорбиновую кислоту, на различных неподвижных фазах (в том числе аминофазе, обращенных фазах C-8 и C-2). На колонках с аминофазой была разделена смесь рибофлавина, пиридоксина, аскорбиновой и фолиевой кислот и тиамина (элюент — смесь ацетонитрил/1 мМ Na_2HPO_4 , рН 3, 80:20). На колонке с фазой C-8 разделить аскорбиновую и фолиевую кислоты не удалось (градиентное элюирование от 1% карбоната аммония в воде до метанола, 4%/мин). В то же время на колонке с фазой C-2 были разделены ниацин, пиридоксин, тиамин, рибофлавин, аскорбиновая и фолиевая кислоты (указаны в порядке элюирования при градиентном элюировании от 5 до 60% метанола в 0,5%-ном водном растворе гексадецилтриметиламмонийбромид, 3,8%/мин).

Растворы для внутривенных инъекций, помимо аминокислот и углеводов (ксилита, инозита, сорбита) могут содержать водорастворимые витамины (B_2 , B_6 , С, ниацинамид). Автор работы [101] разделил эти компоненты на аминофазе, осуществляя их

элюирование смесью 10 мМ KH_2PO_4 (рН 4,3)/ацетонитрил в ступенчатом градиентном режиме.

Для определения содержания аскорбиновой кислоты в поливитаминных продуктах и некоторых пищевых продуктах, например томатном соке, авторы работы [128] применили ион-парную хроматографию на обращенной фазе μ -бондапак C_{18} , элюентом служил 1 мМ раствор формиата тридециламмония в смеси 50% метанола/ H_2O . Следует отметить, что к настоящему времени известно не так много публикаций, посвященных исследованиям аскорбиновой кислоты в биологических пробах, но наличие различных доступных систем для специфического обнаружения, например электрохимических детекторов, позволяет предположить, что число таких работ в будущем возрастет.

Авторы работы [129] провели хроматографический анализ образцов мочи на колонке с μ -бондапаком C_{18} при элюировании 0,8%-ной метафосфорной кислотой с тем, чтобы изучить роль абсорбции аскорбиновой кислоты после перорального или внутривенного введения доз витамина С, превышающих 500 мг. В работе [130] описано определение аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот в различных биологических пробах путем разделения на колонке с аминофазой при элюировании смесью 2,5 мМ KH_2PO_4 /ацетонитрил (50:50) и обнаружении при помощи УФ-детектора. Преимущество применения электрохимических методов обнаружения аскорбиновой кислоты показано в работе [131], авторы которой исследовали ее содержание в тканях мозга при помощи хроматографии на сильном анионообменнике и элюировании 10 мМ NaH_2PO_4 . Авторы работы [132] расширили область применения электрохимического обнаружения аскорбиновой кислоты: они прибегли к этому способу обнаружения аскорбиновой кислоты в различных продуктах детского питания, фруктовых соках, искусственных заменителях соков, фруктах, злаках, молочных продуктах, поливитаминных препаратах, моче и т. д. (рис. 12.13). Эти авторы использовали амперометрический детектор с электродом на основе угольной пасты (применяемый в ТСХ), а хроматографирование проводили на колонке с сильным анионообменником. Элюентом служила смесь 3%-ной метафосфорной и 8%-ной уксусной кислот. Это исследование [132] демонстрирует преимущество использования специфических и чувствительных детекторов для обнаружения индивидуальных соединений, входящих в состав сложных природных смесей.

Электрохимические детекторы были также применены [133] для обнаружения аскорбиновой кислоты в морских животных; хроматографическое разделение было осуществлено на колонке с анионообменником. Интересный подход описан в работе [88], авторы которой заменили органические ион-парные соединения неорганическими ионами в высокой концентрации. Разделение

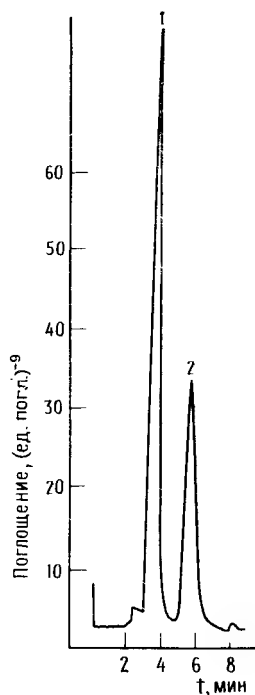


Рис. 12.13. Разделение методом анионообменной хроматографии мочевой (1) и аскорбиновой (2) кислот, содержащихся в моче человека [132].

Колонка: 500×2,1 мм, стеклянная; неподвижная фаза: зипакс SAX; элюент: 50 мМ ацетатный буфер, pH 4,75; температура: 25 °C; объемная скорость: 0,33 мл/мин; обнаружение: электрохимический детектор, потенциал 700 мВ относительно Ag₂AgCl; проба: разбавленная в соотношении 1:100 проба мочи, содержащая 19 нг аскорбиновой кислоты.

проводилось на колонке, заполненной силикагелем с привитыми октадецильными группами; аскорбиновая кислота, ниацин, пиридоксин, ниацинамид и тиамин элюировались 0,5 мМ раствором сульфата лития в смеси вода/метанол (95:5).

12.2.5. Никотиновая кислота

Данные о разделении никотиновой кислоты и ее амида приведены в ряде публикаций, посвященных групповому разделению водорастворимых витаминов, о которых уже говорилось в данной главе [84—86, 88, 101]. Однако применение ВЭЖХ для определения этих веществ в биологических материалах — пище, биологических жидкостях или тканях — рассмотрено лишь в считанных работах. К сожалению, для хроматографических ме-



Рис. 12.14. Структура никотиновой кислоты и никотинамида.

тодов в данном случае характерна низкая чувствительность (так, например, концентрация никотиновой кислоты в пищевых продуктах должна превышать 10 мг/л) [134]. В ряде ситуаций поэтому применяют менее селективные, но более чувствительные методы анализа, например ГЖХ [135—137].

12.2.6. Фолиевая кислота

К природным производным фолиевой кислоты относится семейство соединений, отличающихся по степени окисления птеридинового кольца, по числу остатков глутамата и по состоянию заместителя с одним углеродным атомом в положении N-5 или N-10.

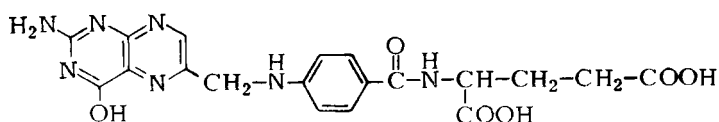


Рис. 12.15. Структура фолиевой кислоты.

Традиционно полиглутаминовые производные анализируют после их предварительного гидролиза до соответствующих моноглутаматов методом ионообменной хроматографии на неподвижных фазах на основе целлюлозы. Метод трудоемок, отличается низкой чувствительностью и плохой воспроизводимостью. Именно эти причины и стимулировали разработку ряда методов ВЭЖХ (табл. 12.11).

12.3. Исследование витаминов в биологических объектах

Задача хроматографического разделения стандартных смесей большинства витаминов была решена в начале 70-х годов, однако разделение витаминов и их производных, содержащихся в биологических пробах, до сих пор представляет собой одну из сложнейших задач аналитической химии и биохимии. Для решения этой задачи можно использовать три основных подхода. На стадии *подготовки пробы* из нее удаляют основную массу органических и неорганических компонентов и повышают концентрацию витаминов настолько, чтобы она соответствовала пределу их обнаружения. Классические методы подготовки образцов — экстракция и упаривание — не только трудоемки, но и отличаются плохой воспроизводимостью (последний недостаток можно исправить путем введения внутренних стандартов). Кроме того, в результате воздействия тепла или света в пробе мо-

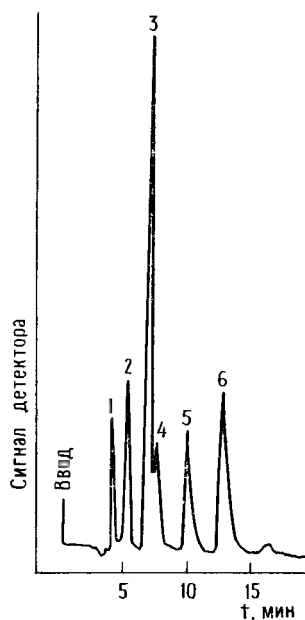


Рис. 12.16. Разделение методом ион-парной хроматографии трех форм фолиевой кислоты с различной степенью окисления и N-(*p*-аминобензоил)-L-глутаминовой кислоты [140].

Колонка: 300×4 мм; неподвижная фаза: μ -бондапак C_{18} (10 мкм); элюент: 35%-ный раствор метанола в воде и 5 мМ тетрабутиламмонийфосфат; объемная скорость: 1 мл/мин, температура: комнатная; обнаружение: УФ-детектор, 254 нм.

1 — меркаптоэтанол; 2 — 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота; содержащая примеси; 3 — N-(*p*-аминобензоил)-L-глутаминовая кислота; 4 — 5,6,7-тетрагидрофолиевая кислота; 5 — 7,8-дигидрофолиевая кислота; 6 — фолиевая кислота.

гут протекать нежелательные реакции, например фотоизомеризация ретиналей [15] или окисление аскорбиновой кислоты [130], и на хроматограмме будут появляться ложные пики.

Избежать нежелательных превращений витаминов можно, пользуясь двумя следующими подходами. Во-первых, удалить из пробы высокомолекулярные соединения (например, белки) и соли можно при помощи гель-проникающей хроматографии [3, 4, 47]. Во-вторых, очистка и концентрирование проб могут проводиться при помощи предколонок непосредственно в процессе разделения и анализа. Таким способом отделяют высокополярные вещества (соли и белки) и увеличивают концентрацию витаминов в образце. Второй подход развит сравнительно недавно [146, 147] и еще не нашел широкого применения в анализе витаминов. Потенциальная возможность его применения представляется весьма многообещающей.

Выбор оптимальных условий для *селективного разделения* позволяет исключить влияние побочных продуктов на результаты разделения. Авторы работы [142] подобрали условия, позволявшие удерживать на колонке производные фолиевой кислоты в результате образования ионных пар *in situ* до тех пор, пока из нее не удалялись мешающие определению соединения, содержащиеся в пробах пищевых продуктов.

Повышение селективности обнаружения — третий возможный путь совершенствования методики анализа витаминов в биологических пробах. Наиболее простой подход заключается в пра-

Таблица 12.11. Методы разделения фолиевой кислоты и ее производных при помощи ВЭЖХ

Исследуемые соединения ^а	Неподвижная фаза ^б	Элюент	Применение	Литература
Никотиновая кислота, рибофлавин-монофосфат, фолиевая кислота	Анионообменник	NaH_2PO_4 (pH 4,4), градиент от 4 до 200 мМ, 10%/мин	Стандартные растворы	84
Аскорбиновая кислота, никотиновая кислота, никотинамид, фолиевая кислота, витамин B_{12} , рибофлавин, тиамин	C-18	ИПХ-А в H_2O /метанол (70 : 30)	Стандартные растворы	85
Никотиновая кислота, витамины B_6 , B_2 , С фолиевая кислота, тиамин	$-\text{NH}_2$	1 мМ Na_2HPO_4 (pH 3,0)/ацетонитрил (20 : 80)	Стандартные растворы	86
Никотиновая кислота, витамины B_6 , B_1 , B_2 , С, фолиевая кислота	C-2	А: 0,5% гексадецилтриметиламмонийбромид, Б: метанол; градиент от 5 до 60% Б, 3,8% мин	Стандартные растворы	86
Фолиевая кислота и 9 производных	Сильный анионообменник	Градиентное элюирование	Стандартные растворы	138
<i>n</i> -Аминобензилглутамат, 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота, 7,8-дигидрофолиевая кислота	Слабый анионообменник	25 мМ NaH_2PO_4	Стандартные	139
<i>N</i> -(<i>n</i> -Аминобензил)-1-глутаминовая кислота, 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая и 7,8-дигидрофолиевая кислоты	C-18 (ИПХ)	35%-ный метанол/ H_2O /тетрабутиламмонийфосфат	Стандартные растворы	140
N^5 -Формилтетрагидрофолиевая кислота, N^5 -метилтетрагидрофолиевая кислота, фолиевая кислота	Анионообменник	KClO_4 , градиент от 0 до 6 мМ, 1%/мин	Сыворотка крови после обработки фолатом	141

Дигидрофолиевая кислота, N ⁵ -формилтетрагидрофолиевая кислота, фолиевая кислота и N ⁵ -метилтетрагидрофолиевая кислота	C-18 (ИПХ)	5 мМ тетрабутиламмоний-фосфат в смеси метанол/Н ₂ O (30 : 70)	Сыворотка крови после обработки фолатом	141
n-Аминбензоилглутамат, 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота, фолиевая кислота, 7,8-дигидрофолиевая кислота, 5-метилтетрагидрофолиевая кислота	C-Фенил (ИПХ)	36 мМ NaClO ₄ , 130 мМ KH ₂ PO ₄ , 0,9 мМ КОН, 0,5% метанола (после уравнивания тетрабутиламмонийфосфатным буфером)	Пищевые продукты, очищенные с помощью ИПХ	142
n-Аминобензоилглутамат, 5-формилтетрагидрофолиевая кислота, дигидрофолиевая кислота, 5-метилтетрагидрофолиевая кислота, фолиевая кислота	C-18 (ИПХ)	Градиент от 5 мМ тетрабутиламмонийфосфатного буфера до метанола	Стандартные растворы	143
5-Метилтетрагидрофолиевая кислота	Сильный анионообменник и C-18	50 мМ иатрийфосфатный буфер (рН 4,95)/метанол (4 : 1)	Плазма крови и спинномозговая жидкость; электрохимическое обнаружение после обогащения проб на колонке	144
n-Аминобензоилглутамат, 10-формилтетрагидрофолиевая кислота, 5-формилтетрагидрофолиевая кислота, дигидрофолиевая кислота, 5-метилтетрагидрофолиевая кислота, фолиевая кислота, различные продукты разложения	C-18 (ИПХ)	Тетрабутиламмонийфосфат А: в воде, Б: в метаноле. Выпуклый градиент от 15 до 25% Б (10 мМ ТБАФ, 50%-ный метанол)	Стандартные растворы	145

^a Перечислены в порядке элюирования. ^б Обозначения неподвижных фаз те же, что и в табл. 12.10. ^в Неполное разделение.

вильном выборе длины волны УФ-детектора, при которой сигналы сопутствующих соединений минимальны. Однако возможности этого подхода ограничены из-за широкого УФ-спектра последних. Для обнаружения токоферолов следует выбирать детекторы по флуоресценции, поскольку чувствительность обнаружения при этом существенно возрастает (см., например, [56, 57]). Для обнаружения водорастворимых витаминов типа аскорбиновой и фолиевой кислот наиболее пригодны электрохимические детекторы, позволяющие повысить селективность обнаружения. Авторы работы [132] наглядно продемонстрировали это на примере определения аскорбиновой кислоты в различных пробах.

В заключение необходимо подчеркнуть, что при хроматографическом анализе витаминов в биологических пробах следует уделять большое внимание подготовке последних к разделению, поскольку длительность эксплуатации хроматографической колонки, стабильность ее характеристик и эффективность разделения могут значительно снизиться под влиянием сопутствующих витаминов компонентов.

Литература

1. Zakaria M., Simpson K. J. *Chromatogr.*, **176**, 109 (1979).
2. Camma H. R., Collins F. D., Morton R. A. *Biochem. J.*, **50**, 48 (1951).
3. Williams R. C., Schmit J. A., Henry R. A. *J. Chromatogr., Sci.*, **10**, 494 (1972).
4. McCormick A. M., Napoli J. L., DeLuca H. F. *Meth. Enzymol.*, **67**, 220 (1980).
5. McCormick A. M., Napoli J. L., DeLuca H. F. *Anal. Biochem.*, **86**, 25 (1978).
6. Paanakker J. E., Groenedijk G. W. T. *J. Chromatogr.*, **168**, 125 (1979).
7. Besner J. G., Leclaire R., Band P. R. *J. Chromatogr.*, **183**, 346 (1980).
8. de Ruyter M. G. M., de Leenheer A. P. *Anal. Chem.*, **51**, 43 (1979).
9. Burns D. T., Mackay C. J. *Chromatogr.*, **200**, 300 (1980).
10. de Leenheer A. P., DeBevere V. O. R. C., de Ruyter M. G. M., Claeys A. E. *J. Chromatogr.*, **162**, 408 (1979).
11. Schmit J. A., Henry R. A., Williams R. C., Dieckman J. F. *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 645 (1971).
12. Tsukida K., Kodama A., Ho M. J. *Nutr. Sci. Vitaminol.*, **24**, 593 (1978).
13. Pilkiewicz F. G., Pettei M. J., Yudd A. P., Nakanishi K. *Exp. Eye Res.*, **24**, 421 (1977).
14. Tsukida K., Kodama A., Ito M. J. *Chromatogr.*, **134**, 331 (1977).
15. Tsukida K., Masahara R., Ito M. J. *Chromatogr.*, **192**, 395 (1980).
16. Hänni R., Hervouet D., Busslinger A. J. *Chromatogr.*, **162**, 615 (1979).
17. Puglisi C. V., de Silva J. A. F. *J. Chromatogr.*, **152**, 421 (1978).
18. Halley B. A., Nelson E. C. *J. Chromatogr.*, **175**, 113 (1979).
19. Eriksson M., Eriksson T., Sørensen B. *Acta Pharm. Suec.*, **15**, 274 (1978).
20. Vecchi M., Vesely J., Oesterhelt G. *J. Chromatogr.*, **83**, 447 (1973).
21. Tomkins D. F., Tscherne R. J. *Anal. Chem.*, **46**, 1602 (1974).
22. Tartivita K. A., Sciarrello J. P., Rudy B. C. *J. Pharm. Soc.*, **65**, 1024 (1976).
23. Krol G. J., Mannan G. A., Gemmill R. Q., Hicks G. E., Kho B. T. *J. Chromatogr.*, **74**, 43 (1972).

24. Takada K., Okano T., Tamura Y., Matsu S., Kobayashi T. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25, 385 (1979).
25. Tiebach R. K. D., Schramm M. Chromatographia, 13, 403 (1980).
26. Cohen H., Lapointe M. J. Chromatogr. Sci., 17, 510 (1979).
27. Tscherne R. J., Capitanio G. J. Chromatogr., 136, 337 (1977).
28. Walker G. A., Carpenter B. E., Tiescher D. L. J. Pharm. Sci., 69, 846 (1980).
29. Vanhaelen-Fastre R., Vanhaelen M. J. Chromatogr., 153, 219 (1978).
30. Egaas E., Lambersten G. Internat. J. Vit. Nutr. Res., 49, 35 (1979).
31. De Vries E. J., Zeeman J., Esser R. J. E., Borsje B., Mulder F. J., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62, 129 (1979).
32. Hofsass H., Alicino N. J., Hirsch A. L., Ameika L., Smith L. D. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 735 (1978).
33. DeLuca H. F. N. Engl. J. Med., 289, 359 (1973).
34. DeLuca H. F., Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 33, 2211 (1974).
35. Fraser D. R. Proc. Nutr. Soc., 34, 139 (1975).
36. DeLuca H. F. Clin. Endocrinol., 5, Suppl. 979 (1976).
37. DeLuca H. F. Biochem. Pharmacol., 26, 563 (1977).
38. Ikekawa N., Koizumi N. J. Chromatogr., 119, 227 (1976).
39. Eisman J. A., Shepard R. M., DeLuca H. F. Anal. Biochem., 80, 298 (1977).
40. Vanhaelen-Fastre R., Vanhelen M. J. Chromatogr., 179, 131 (1979).
41. Jones G., DeLuca H. F. J. Lipid Res., 16, 448 (1975).
42. Jones G. Clin. Chem., 34, 287 (1978).
43. Okano T., Marsuyama N., Kobayashi T., Kurado E., Kodama S., Matsuo T. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25, 479 (1979).
44. Matsuyayama N., Okano T., Takada K., Takao T., Terao Y., Hashimoto N., Kobayashi T. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25, 469 (1979).
45. Pelc B., Holmes A. L. J. Chromatogr., 173, 403 (1979).
46. Gilbertson T. J., Stryd R. P. Clin. Chem., 23, 1700 (1977).
47. Shepard R. M., DeLuca H. F. Meth. Enzymol., 67, 393 (1980).
48. Schaefer P. C., Goldsmith R. S. J. Lab. Clin. Med., 91, 104 (1978).
49. Thompson J. N., Maxwell W. B., L'Abbe M. Anal. Biochem., 85, 283 (1978).
50. Koshy K. T., Van Der Slik A. L. Anal. Biochem., 85, 283 (1978).
51. Ray A. C., Dwyer J. N., Reagov J. C. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, 1296 (1977).
52. Koshy K. T. Meth. Enzymol., 67, 357 (1980).
53. Tsukida K. Meth. Enzymol., 67, 326 (1980).
54. Tanaka Y., DeLuca H. F., Ikekawa N. Meth. Enzymol., 67, 370 (1980).
55. Baxter J. G., Robenson C. D., Taylor J. D., Lehman R. W., J. Am. Chem. Sci., 65, 918 (1943).
56. Thompson J. N., Hatina G. J. Liq. Chromatogr., 2, 327 (1979).
57. Hatam L. J., Kayden H. J. J. Lipid Res., 20, 639 (1979).
58. Jansson L., Nilsson B., Lindgreen R. J. Chromatogr., 181, 242 (1980).
59. McMurray C. H., Blanchflower W. J. Chromatogr., 178, 525 (1979).
60. DeLeenheer A. P., DeBevere V. O., Cruyl A. A., Claeys A. E. Clin. Chem., 24, 585 (1978).
61. Nilsson B., Johansson B., Jansson L., Holmberg L. J. Chromatogr., 145, 169 (1978).
62. McMurray C. H., Blanchflower W. J. J. Chromatogr., 176, 488 (1979).
63. Vatassery G. T., Maynard V. R., Hagen D. F. J. Chromatogr., 161, 299 (1978).
64. Emson C. T., Sadowski J. A., Suttie J. W. J. Biol. Chem., 250, 4744 (1975).
65. Mayer H., Gloor U., Isler O., Rugg R., Wiss O. Helv. Chim. Acta, 47, 221 (1964).
66. Jackman L. M., Rugg R., Ryser G., von Planta C., Gloor U., Schudel P., Kofler M., Isler O. Helv. Chim. Acta, 48, 1382 (1965).
67. Matschiner J. T., Bell R. G. J. Nutr., 102, 625 (1972).

68. *Khaner T. E., Siegfired C., Willingham A. K., Matschiner J. T.* J. Nutr., **105**, 1519 (1975).
69. *Lowenthal J., Rivera G. M. V. J.* Pharmacol. Exp. Therm., **209**, 330 (1979).
70. *Thierry-Palmer M. J., Stern M. S., Kost C. A., Montgomery J. C.*, in: Suttie J. W. (Ed.): Proc. 8th Steenbock Symposium Vitamin K Metabolism and Vitamin K=Dependent Proteins Madison, Wisconsin, June 10—13, 1979, p. 333. University Park Press, Baltimore 1980.
71. *Matschiner J. T., Bell R. G., Amelotti J. M., Knauer T. E.* Biochim. Biophys. Acta, **201**, 309 (1970).
72. *Elliot G. R., Odam E. M., Townsend M. G.* Biochem. Soc. Trans., **4**, 615 (1976).
73. *Bjornsson T. D., Swezey S. E., Mettin P. J., Blaschke T. F.* Thromb. Haemostas **39**, 466 (1978).
74. *Domahey P. L., Burt V. T., Rees H. H., Pennock J. F. J.* Chromatogr., **170**, 272 (1979).
75. *Shearer M. J., Allan V., Haroon Y., Barkham P.*, in Suttie J. M. (Ed.): Proc. 8th Steenbock Symposium Vitamin K Metabolism and Vitamin K=Dependent Proteins, Madison, Wisconsin, June 10—13, 1979, p. 317, University Park Press, Baltimore 1980.
76. *Harron Y., Shearer M. J., Barkham P. J.* Chromatogr., **200**, 293 (1980).
77. *Matshiner J. T., Taggart W. V.* Anal. Biochem., **18**, 88 (1967).
78. *Bollinger H. R.* in: E. Stahl (Ed.): Thin Layer Chromatography, 2nd Engl. Ed., p. 259, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1969.
79. *Matschiner J. T., Ameotti J. M. J.* Lipid. Res., **9**, 176 (1968).
80. *Lefevre M. F., De Leenheer A. P., Claeys A. E. J.* Chromatogr., **186**, 749 (1979).
81. *Von Muralt A.* Vitamin Horm. (N. Y.), **5**, 93 (1941).
82. *Hokawa Y., Cooper J. R.* Science, **166**, 759 (1969).
83. *Hokawa Y. J.* Appl. Nutr., **29**, 5 (1977).
84. *Williams R. C., Baker D. R., Schmit J. A. J.* Chromatogr., Sci., **11**, 618 (1973).
85. *Wills R. B. H., Shaw C. G., Day W. R. J.* Chromatogr. Sci., **15**, 262 (1977).
86. *Vandemark F. L.* Chromatogr. Newsl., **8**, 27 (1980).
87. *Kirchmeier R. C., Upton R. P. J.* Pharm. Sci., **67**, 1444 (1978).
88. *Jandera P., Charachek J. J.* Chromatogr., **197**, 181 (1980).
89. *Callmer K., Davies L.* Chromatographia, **7**, 644 (1974).
90. *Gubler C. J., Hemming B. C.* Meth. Enzymol., **62**, 63 (1979).
91. *Roser R. L., Andrist A. H., Harrington W. H., Nailo H. K., Lonsdale D. J.* Chromatogr., **146**, 43 (1978).
92. *Ishi K., Sarai K., Sanemori H., Kawasaki T. J.* Nutr. Sci. Vitaminol., **25**, 517 (1979).
93. *Ishi K., Sarai K., Sanemori H., Kawasaki T.* Anal. Biochem., **97**, 191 (1979).
94. *United States Pharmacopeia*, p. 627. 19th rev. Mack Publishing Co., Easton, P. A. 1975.
95. *Mellor N. P., Maass A.* ? Advances in Automated Analysis, v. 9, p. 67, Mediad, Tarrytown, N. Y., 1973.
96. *Haworth C., Oliver R., Swaile R.* Analyst (London), **96**, 432 (1971).
97. *Telegdy-Konats M., Hegedus M.* Elelmez. Ipar., **24**, 358 (1970).
98. *Baker H., Frank O., Reingold S., Gellene R., Lecvy C., Hunter S. H.*, Am. J. Clin. Nutr., **19**, 17 (1966).
99. *Knox J. H., Pryde A. J.* Chromatogr., **112**, 171 (1975).
100. *Jurand J.*, неопубликованные данные.
101. *Schuster R.* Anal. Chem., **52**, 617 (1980).
102. *Jusco W. J., Levy G. J.* Pharm. Sci., **56**, 58 (1967).
103. *Stripp B.* Acta Pharmacol. Toxicol., **22**, 353 (1965).
104. *Williams A. R., Slavin W.* Chromatogr. Newsl., **5**, 9 (1977).
105. *Smith M. D. J.* Chromatogr., **182**, 285 (1980).

106. Steward K. K., in: Hertz H. S., Chester S. N. (Eds.): National Bureau of Standards: Proc. Ninth Paterials Research Symposium, April 1979, p. 249.
107. Storovick C. A., Benson E. M., Edwards M. A., Woodring M. G. Meth. Biochem. Anal., **12**, 183 (1964).
108. Toepfer E. W., Polansky M. M., in: Harris R. S., Wool I. G., Loraine J. A. (Eds.): Vitamins and Hormones, v. 22, p. 825. Academic Press, New York.
109. Loo Y. H., Cort W. M. Meth. Neurochem., **2**, 169 (1972).
110. Vanderslive J. T., Naire C. E. J. Chromatogr., **196**, 176 (1980).
111. Vanderslice J. T., Stewart K. K., Yarmas M. M. J. Chromatogr., **176**, 280 (1979).
112. d'Reilly W. J., Guele P. J. M., Hoes M. J. A., van der Kleyn E. J. Chromatogr., **183**, 492 (1980).
113. Lim K. L., Young R. W., Driksel J. A. J. Chromatogr., **188**, 285 (1980).
114. Williams A. K. Meth. Enzymol., **62**, 415 (1979).
115. The United States Pharmacopeia, p. 120, 19th Revise, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1975.
116. Barakat M. Z., Shebab S. K., Darwish N., El-Zoheiry A. Anal. Biochem., **53**, 245 (1973).
117. Deutsch M. J., Weeks C. E. J. Assoc. Off. Agric. Chem., **48**, 1248 (1965).
118. Roe J. H., Mills M. B., Oesterling M. J., Damron C. M. J. Biol. Chem., **174**, 201 (1948).
119. Lindquist J., Farroha S. M. Analyst. (London), **100**, 377 (1975).
120. Lindquist J. Analysis (London), **100**, 339 (1975).
121. Ralls J. W. J. Agric. Food Chem., **23**, 609 (1975).
122. Schlack J. E. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **57**, 1346 (1974).
123. Zobel M. Ernährungsforschung, **16**, 257 (1971).
124. Beljaars P. R., Horrocka W. V. S., Rondags T. M. N. J. Assoc. Off. Anal. Chem., **57**, 65 (1974).
125. De Fabrizio F. J. Pharm. Sci., **63**, 91 (1974).
126. Hashmi M. H., Ayaz A. A., Viegas A., Adil A. S. Microchem., **J.**, **16**, 645 (1971).
127. Bui-Nguyen M. H. J. Chromatogr., **196**, 163 (1980).
128. Sood S. P., Sartori L. E., Wittmer D. P., Hamey W. G. Anal. Chem., **48**, 796 (1976).
129. Wagner E. S., Lindley B., Coffin R. D. J. Chromatogr., **163**, 225 (1979).
130. Rose R. C., Nahworld D. L. Anal. Biochem., **114**, 140 (1981).
131. Thrivikraman K. V., Refshauge C., Adams R. N. Life Sci., **15**, 1355 (1974).
132. Pachla L. A., Kissinger P. T. Anal. Chem., **48**, 364 (1976).
133. Carr R. S., Neff J. M. Anal. Chem., **52**, 2428 (1980).
134. Wittmer D. P., Haney W. G. Jr., in: Tsuji K. (Ed.): GLC and HPLC Determination of Therapeutic Agents, p. 1243, Marcel Dekker, New York — Basel.
135. Peosser A. R., Sheppard A. J. J. Chromatogr. Sci., **57**, 1004 (1968).
136. Ashby J. D., Deavin J. C. J. Pharm. Pharmacol., **21**, 525 (1969).
137. Vessman J., Stromberg S. J. Chromatogr. Sci., **64**, 311 (1975).
138. Stout R. W., Cashmore A. R., Coward J. K., Horvath C. G., Bertino J. R. Anal. Biochem., **71**, 119 (1976).
139. Reed L. L., Archer M. C. J. Chromatogr., **121**, 100 (1976).
140. Brantman A. R., McComish M. J. Chromatogr., **151**, 87 (1978).
141. Chapman S. K., Greene B. C., Streiff R. R. J. Chromatogr., **145**, 302 (1978).
142. Reingold R. N., Picciano M. F., Perkins E. G. J. Chromatogr., **190**, 237 (1980).
143. Allen B. A., Newman R. A. J. Chromatogr., **190**, 241 (1980).
144. Lankelma J., von der Kleijn E., Jansen M. J. T. J. Chromatogr., **182**, 35 (1980).
145. Horne D. W., Briggs W. T., Wagner C. Anal. Biochem., **116**, 393 (1981).
146. Voelter W., Kronbach T., Zech K., Huber R. J. Chromatogr., **239**, 475 (1982).
147. Roth W., Beschke K., Jauch R., Zimmer A., Koss F. W. J. Chromatogr., **222**, 13 (1981).

Органические кислоты в организме человека

Х. Либих (H. Liebig)

13.1. Введение. Органические кислоты и медицина

К органическим кислотам, находящимся в крови и моче человека, относится широкий круг соединений, образующихся в процессе самых различных биохимических реакций. Основными путями образования органических кислот являются а) расщепление аминокислот с разветвленной боковой цепью (валин, лейцин, изолейцин), б) метаболизм ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан, гистидин), в) метаболизм биогенных аминов, г) β - и ω -окисление жирных кислот, д) кетогенез, е) биосинтез жирных кислот, ж) метаболизм моносахаридов.

Образование органических кислот может происходить и по другим метаболическим путям, как известным, так и пока неизвестным.

В соответствии с их химическими свойствами органические кислоты можно разделить на жирные, алифатические дикарбоновые, алифатические оксокарбокарбоновые и алифатические гидроксикарбоновые, фенолы, ароматические, фуранокарбоновые и азотсодержащие алифатические и ароматические кислоты и кислые конъюгаты.

Анализ органических кислот имеет большое значение как для фундаментальных биохимических исследований, так и для прикладной и клинической биохимии. Объектами исследования фундаментальной биохимии могут быть, например, процессы разрушения различных соединений, процессы ω -окисления при метаболизме жирных кислот или процессы биосинтеза кетоновых тел и высокомолекулярных кетоновых тел. Объектом прикладных исследований может быть диагностика, основанная на установлении аномальной концентрации ряда органических кислот в моче или сыворотке крови в патологическом состоянии организма, например повышенного содержания в моче фенилпировиноградной кислоты, наблюдаемого вследствие врожденного дефицита активности фермента фенилаланин-4-гидроксилазы, или ванилилминдальной кислоты в моче при таких опухолевых заболеваниях, как феохромоцитоме или нейробластома. В данной главе будут рассмотрены в основном прикладные аспекты, свя-

занные с аналитическим определением органических кислот, иными словами, будет рассмотрена возможность использования органических кислот в качестве диагностических маркеров.

13.2. Методические аспекты

13.2.1. Выделение органических кислот

В некоторых случаях обнаружение и количественное определение индивидуальных органических кислот может быть осуществлено непосредственно в биологических жидкостях при помощи специфических реакций. Содержание молочной кислоты измеряют при помощи ферментативной реакции, катализируемой лактат-дегидрогеназой [1], ацетоуксусной кислоты — при помощи реакции, катализируемой ферментом β -гидроксibuтират-дегидрогеназой [2], мочевой кислоты — на основе колориметрической [3] или ферментативной [4] реакции, фенилпиروвиноградной кислоты — при помощи колориметрической реакции [5]. Определение некоторых кислот можно осуществить методом ВЭЖХ без какой-либо предварительной обработки биологических образцов. Таким способом определяют, например, гиппуровую кислоту в моче [6], 5-гидроксииндолил-3-уксусную кислоту в моче [7] и спинномозговой жидкости [8], гомованилиновую кислоту в моче [9] и спинномозговой жидкости [8]. Непосредственный анализ пробы мочи методом ВЭЖХ позволяет также установить профиль органических кислот [10, 11].

В большинстве случаев, в частности при применении ГХ или ВЭЖХ — двух основных аналитических методов разделения, органические кислоты следует предварительно выделить из биологического материала. Выделение кислотных компонентов осуществляется экстракцией органическими растворителями и анионообменной хроматографией.

Экстракцию, как правило, проводят диэтиловым эфиром [12—15], этилацетатом [16—24] или их смесью [25, 26], например, в соотношении 1:1. Другие растворители, в том числе дихлорметан [27], дихлорметан/*трет*-амиловый спирт (2:1) [28], дихлорметан/изопропанол (9:1) [29], бензол/этилацетат (1:1) [30], используются реже. Для улучшения экстракции образцы мочи или сыворотки крови можно насыщать солями, например хлоридом натрия. Эти методы не требуют значительных затрат времени, так как они осуществляются чаще в периодическом, а не в непрерывном режиме. Однако они не являются количественными для многих органических кислот, особенно полигидроксикарбоновых и других сильнополярных кислот. Из исследуемых жидкостей перед проведением экстракции необходимо удалять белки путем диализа или осаждения. Последовательный метод предпочтителен, поскольку при диализе часть

связанных с белком органических кислот может теряться. Следует иметь в виду, однако, что некоторые органические кислоты могут соосаждаться с белками.

Выделение органических кислот при помощи анионообменной хроматографии используется часто, особенно при изучении профиля кислот. В этих целях применяют ДЭАЭ-сефадекс [31—34], дауэкс [35], амберлист А-26 [36, 37] и другие анионообменные смолы. Анионообменная хроматография более трудоемка, чем экстракция, но позволяет получать количественные выходы кислот. Поэтому ее применение предпочтительно в тех случаях, если необходимо детальное изучение содержания органических кислот различных классов, включая гидроксикарбоновые кислоты, или если необходимо определить незначительные изменения содержания органических кислот. Преимущества метода выделения полигидроксикарбоновых кислот при помощи хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе по сравнению с осаждением смесью диэтиловый эфир/этилацет подробно обсуждены в работе [38]. Следует также отметить, что авторы работы [39] получили хорошие результаты при построении профиля органических кислот с использованием колонки с экстралутом (Extrelut).

13.2.2. Получение производных органических кислот

При разделении органических кислот методом ВЭЖХ их не нужно переводить в производные, отличающиеся повышенной летучестью и термостойкостью, что необходимо при применении ГХ. Поэтому во многих случаях выделенные органические кислоты непосредственно исследуют методом ВЭЖХ. Однако разделение органических кислот в виде производных позволяет повысить чувствительность обнаружения. Фенилпировиноградная кислота реагирует с 4'-гидразин-2-стильбазолом в водном растворе метанола с образованием соответствующего флуоресцирующего гидразона [30], или же ее можно подвергнуть предколоночной модификации 2,3-диаминонафталином для увеличения чувствительности УФ-обнаружения [40]. 2-Оксокарбоновые кислоты разделяют (и обнаруживают) в виде 2,4-динитрофенилгидразонов [41] или хиноксалинов после реакции с *о*-фенилендиаминном [42]. В сыворотке крови обнаруживают свободные жирные кислоты по флуоресцентной метке (4-бромометил-7-метоксикумарин) [29, 43].

Для разделения органических кислот при помощи ГХ получение производных является необходимым условием. Чаще всего кислоты хроматографируют в виде триметилсилиловых или метиловых эфиров. Триметилсилилирование осуществляется обработкой бис(триметилсилил)трифторацетамидом (БСТФА) [25, 33, 44—49] или бис(триметилсилил)ацетамидом [22—24,

32, 50—53]. Метилируют чаще всего органические кислоты диазометаном [13, 26, 36, 39, 54—59].

Методы разделения и обнаружения органических кислот в виде триметилсилиловых и метиловых эфиров имеют ряд и достоинств, и недостатков. В целом предпочтение может быть отдано метиловым эфирам. Если для идентификации органических кислот применяется хромато-масс-спектрометрия, то предпочтительны метиловые эфиры, поскольку интерпретация их масс-спектров менее сложна, так как структура образующихся фрагментов более проста и результаты легче предсказать. При условии соблюдения необходимых мер предосторожности метилирование диазометаном представляет собой очень простую и быструю процедуру. Тем не менее и ей свойственны определенные недостатки. Во-первых, метилированию подвергаются гидроксильные группы фенолокислот, что не позволяет провести различие между исходными ароматическими ОН-группами и ОСН₃-группами. Во-вторых, в процессе обработки диазометан может вступать в реакцию с двойными связями ненасыщенных дикарбоновых кислот, например фумаровой. Это приводит к возникновению ложных пиков. Недостатки такого же рода можно ожидать и при хроматографировании триметилсилильных эфиров.

Среди других методов модифицирования карбоксильных групп органических кислот можно упомянуть получение гексафторизопропиловых [60, 61] и пентафторбензиловых [62] эфиров, используемое, в частности, при обнаружении электронозахватным детектором.

Кроме карбоксильных групп модифицированию могут подвергаться и другие функциональные группы органических кислот. Гидроксикарбоновые кислоты образуют триметилсилиловые эфиры (при триметилсилилировании). При метилировании же этого обычно не происходит.

Карбонильные группы оксокарбоновых кислот трансформируют в оксисы [23, 24, 53, 63], О-метилоксисы [36], О-этилоксисы [31, 46] или О-триметилсилилхиноксалины [64, 65]. Большинство оксокарбоновых кислот неустойчивы в условиях ГХ-анализа, если их карбонильные группы находятся в немодифицированном состоянии. Фенольные ОН-группы модифицируют с помощью ангидридов трифторуксусной [60, 61] или гептафтормасляной [62] кислот, что позволяет осуществлять обнаружение с помощью электронозахватных детекторов.

13.2.3. Предварительное фракционирование

В сыворотке крови и моче содержатся очень сложные смеси органических кислот, поэтому необходимо проводить предварительное фракционирование анализируемого образца, особенно

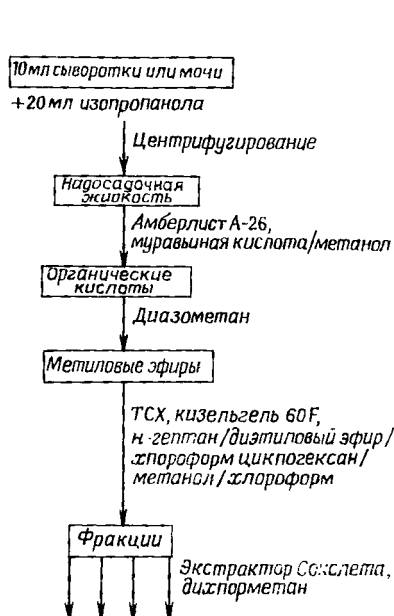


Рис. 13.1. Схема анализа органических кислот (включая предварительное фракционирование).

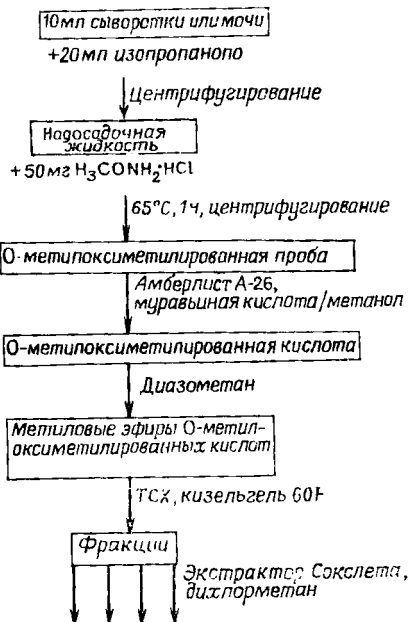


Рис. 13.2. Схема анализа оксокарбоновых кислот (включая предварительное фракционирование).

если концентрация изучаемых кислот в нем невелика. Эффективное предварительное фракционирование проводится при помощи препаративной ТСХ [36, 55] и ВЭЖХ [55]. Схемы, приведенные на рис. 13.1 и 13.2, иллюстрируют общие методы предварительного фракционирования органических кислот на основе препаративной ТСХ для последующего анализа с помощью ГХ (рис. 13.1) и предварительного фракционирования оксокарбоновых кислот, необходимого для защиты карбонильных групп (рис. 13.2).

Метод предварительного фракционирования заключается в следующем. Смесь метиловых эфиров органических кислот (или О-метилоксиметилированных эфиров) разделяют на четыре (или большее число) фракций на пластинках для ТСХ (20 × 20 см) со слоем кизельгеля 60 F₂₅₄. С этой целью пробу наносят на левую сторону пластинки в виде полосы длиной 13 см. На правую сторону наносят стандартную смесь, например смесь метилстеарата, метилфенилацетата, метилиндолбутирата и диметилтартата. Пластинку обрабатывают последовательно двумя смесями растворителей. Первой из них (н-гептан/диэтиловый эфир/хлороформ, 40 : 30 : 30) дают подняться до верхнего края

пластинки, после чего отмечают положение метилиндолабутирата (УФ-лампа, 254 нм). Далее пластинку обрабатывают второй смесью растворителей (циклогексан/хлороформ/метанол, 40 : 55 : 5) и дают ей подняться до метки, соответствующей метилиндолабутирату. После этого левую часть пластинки закрывают, а правую опрыскивают 2,7-дихлорфлуоресцеином, чтобы можно было обнаружить соединения, входящие в стандартную смесь (366 нм).

Исходя из положения соединений стандартной смеси, левую часть пластинки делят на четыре зоны: зона между метилстеаратом и метилфенилацетатом — фракция 1, зона между метилфенилацетатом и метилиндолабутиратом — фракция 2, зона между метилиндолабутиратом и диметилтартратом — фракция 3, зона между диметилтартратом и стартовой линией — фракция 4. Каждую из четырех фракций вырезают и экстрагируют 12 ч дихлорметаном в непрерывном режиме в аппарате Сокслета. Фракция 1 содержит в основном жирные кислоты, фракция 2 — дикарбоновые кислоты, производные оксокарбоновых кислот и ароматические кислоты, фракция 3 — гидроксикарбоновые, ароматические и азотсодержащие кислоты и кислые конъюгаты, фракция 4 — кислые конъюгаты.

13.2.4. Разделение и обнаружение

Как было отмечено выше, для хроматографического анализа органических кислот можно применять ВЭЖХ и ГХ. При выборе хроматографического метода необходимо иметь в виду следующее. ВЭЖХ экономит время и затраты труда (по сравнению с ГХ), поскольку методика подготовки пробы к анализу более проста. Стадию получения производных обычно можно опустить, предварительное фракционирование также может не потребоваться, так как обнаружение некоторых классов кислот в принципе более специфично, чем при разделении методом ГХ. ВЭЖХ позволяет осуществлять достаточно точный количественный анализ органических кислот. Таким образом, ВЭЖХ пригодна для рутинного количественного анализа ряда органических кислот и кислот с высокой температурой кипения, анализ которых методом ГХ затруднен.

Достоинство ГХ как метода анализа кислот состоит в том, что она допускает возможность исследования более сложного спектра органических кислот, включая те, которые непросто обнаруживать при разделении при помощи ВЭЖХ. В то же время селективность детекторов, используемых в ВЭЖХ, ограничивает их применение. Эффективность разделения кислот методом капиллярной ГХ обычно выше, чем при применении ВЭЖХ. Кроме того, сочетание с масс-спектрометрией более характерно для ГХ. Поэтому к ГХ прибегают в тех случаях, если необходимо

детально исследовать состав органических кислот, не поддающихся обнаружению методами, принятыми в ВЭЖХ, или если обнаружение необходимо осуществлять масс-спектрометрически. Поскольку селективность ГХ-анализа обычно ниже, чем у ВЭЖХ, то, чтобы повысить ее, следует пользоваться специальными детекторами, например термоионным для обнаружения азотсодержащих соединений, или масс-спектрометром, позволяющим идентифицировать соединения по отдельным его фрагментам.

Разделение органических кислот чаще всего проводится методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Этим способом обычно определяют отдельные кислоты или смеси небольшого числа различных кислот. Хорошие результаты получены при разделении и количественном определении метаболитов биогенных аминов, содержащихся в моче и спинномозговой жидкости, в частности 5-гидроксииндол-3-уксусной [7, 16, 20, 28, 66, 67], ванилилминдальной [17, 67, 68], ванилиновой [67, 69], гомованилиновой [9, 17, 67, 70] и 3,4-дигидроксифенилуксусной [19] кислот. В некоторых случаях разделяются смеси аминокислот и аминов или метаболитов гликоля, например 3-метокси-4-гидроксифенилгликоля [8, 19, 69, 71—72]. Исследование превращения тирозина в дигидроксифенилаланин позволяет определять активность фермента тирозингидроксилазы [74].

При помощи ВЭЖХ было осуществлено разделение и определение таких кислот или групп кислот, как гиппуровая [6], мочева [75], хинолиновая [35], урокановая [76], алифатические и ароматические оксокарбоновые кислоты [28, 30, 40, 41] и жирные кислоты [29]. Пример разделения жирных кислот показан на рис. 13.3.

В литературе описаны примеры исследования профилей органических кислот методами обращенно-фазовой [18, 77] и анионообменной [10, 11] ВЭЖХ. Как показывает хроматограмма, приведенная на рис. 13.4, эффективность разделения достаточно хорошая.

В описанных выше примерах применения ВЭЖХ для обнаружения были использованы УФ- и электрохимические детекторы, а также детекторы по флуоресценции.

Газохроматографическое разделение органических кислот осуществляется на капиллярных колонках, стеклянных или кварцевых, которые пришли на смену набивным колонкам. Наилучшие результаты получены на фазах OV-17, OV-101 и SE-30. Для обнаружения наиболее широко используется пламенно-ионизационный детектор.

Следует подчеркнуть, что каждый исследователь, занимающийся хроматографическим разделением органических кислот, не должен забывать о возможности появления ложных пиков, которое может быть связано с предварительной обработкой про-

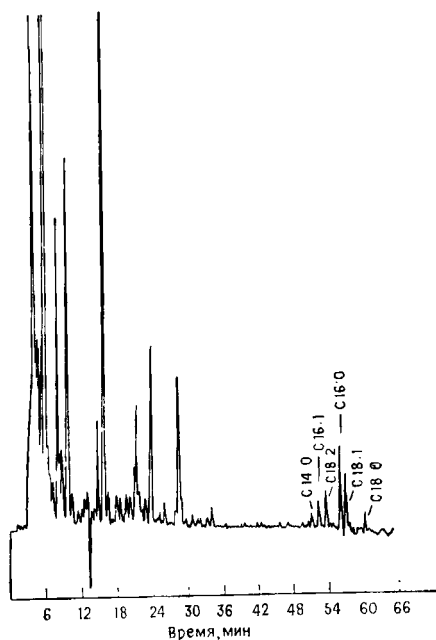


Рис. 13.3. Хроматограмма экстракта сыворотки крови собаки, полученная методом ВЭЖХ [29].

Колонка: 250×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: RP-8 (5 мкм); перед разделением проводилась обработка 4-бромметил-7-кумарином.

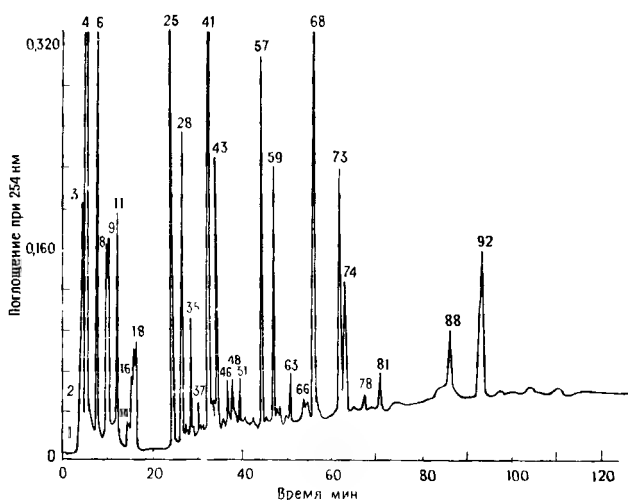


Рис. 13.4. Хроматограмма мочи здорового мужчины [10].

Колонка: 500×4 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: дианон CDR-10.

1 — тригонеллин; 3 — креатин+креатинин; 6 — псевдоуридин; 9 — пиридоксин; 11 — уратил; 18 — гиноксантии; 25 — ксантии; 35 — урокановая кислота; 41 — мочевая кислота; 43 — 2-амино-3-гидроксибензоилглицин; 48 — диметилурановая кислота; 51 — 5-гидроксиметил-2-фурилглицин; 57 — 2-фурилглицин; 59 — 5-гидроксиметил-2-фуранкарбоновая кислота; 66 — 3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота; 68 — гиппуровая кислота; 73 — хинальдиновая кислота; 74 — 3-гидроксибензоилглицин; 88 — бензойная кислота; 92 — индолилуксусная кислота.

бы или с собственно процессом разделения. Вероятность появления ложных пиков при разделении методом ГХ выше из-за использования высоких температур. Причиной ошибок может быть также влияние лекарственных средств и лечения.

Некоторые примеры появления ложных пиков и других помех описаны в обзоре, посвященном исследованию состава физиологических жидкостей человека [78]. Многие другие примеры такого рода рассмотрены в специальных работах [52, 79, 80].

Число публикаций, посвященных изучению органических кислот, очень велико.

13.3. Органические кислоты как маркеры нарушений метаболизма

В литературе описано более чем 250 органических кислот. Известно примерно еще столько же, но их структура не установлена. Эти кислоты содержатся в сыворотке крови и (или) моче здоровых людей в самых различных концентрациях. Физиологические отклонения, например врожденные дефекты метаболизма, эндокринологические дефекты, определенные виды опухолей, заболевания печени и почек, вызывают весьма резкие изменения содержания какой-либо одной кислоты или одного либо нескольких классов кислот.

Однако в большинстве работ в каждом конкретном случае рассматриваются лишь ограниченное число кислот либо кислоты какого-либо одного класса, изменение содержания которых в биологических жидкостях связано с нарушением метаболизма.

Однако в ряде работ исследован более широкий спектр органических кислот и приведены подробные данные о содержании их в организме здоровых людей [25, 26, 33, 34, 37, 45, 81] и пациентов с нарушениями метаболизма или другими заболеваниями [39, 82, 83], а также изучено влияние на содержание кислот диеты [84]. В большинстве случаев анализируется состав мочи.

Органические кислоты, вероятно, представляют собой именно тот класс низкомолекулярных биологических веществ, хроматографические методы изучения которых внесли наибольший вклад в наши представления о путях метаболизма и в разработку подходов к клинической диагностике нарушений метаболизма, а в ряде случаев позволили разработать соответствующие диагностические методы. Далее мы рассмотрим примеры нарушений метаболизма, приводящие к характерному качественному и количественному изменению содержания органических кислот.

13.3.1. Врожденные нарушения метаболизма

Врожденные дефекты такого рода часто связаны с нарушением метаболизма аминокислот и вызваны недостаточной активностью ферментов на определенных стадиях метаболического пути. Такое нарушение метаболизма довольно часто служит причиной аномального развития детей и приводит к умственной отсталости. Поскольку, выдерживая таких пациентов на специальной диете, можно исключить вероятность их аномального развития, то очень важно установить, функции какого именно фермента нарушены.

Многие из подобных нарушений метаболизма вызывают специфические органические *ацидемии* и (или) *ацидурии*, которые в некоторых случаях сопровождаются *аминоацидемиями* и *ацидаминуриями*.

13.3.1.1. Фенилкетонурия. Это наиболее распространенная болезнь из числа врожденных органических ацидурий, ею страдает один из 10 000 новорожденных [85]. Заболевание фенилкетонурией приводит к умственной отсталости. Например, в группе из 1778 умственно отсталых пациентов 1% страдает фенилкетонурией и примерно 5% — другими формами органической ацидурии [86]. Заболевание фенилкетонурией обусловлено пониженной активностью фермента фенилаланин-4-гидроксилазы (рис. 13.5), что приводит к уменьшению скорости превращения фенилаланина в тирозин и возникновению альтернативного метаболического пути, приводящего к образованию фенилпировиноградной кислоты (соединение 6 на рис. 13.5) и его метаболитов и соответственно увеличению концентрации фенилаланина в крови и фенилвиноградной, фенилмолочной (соединение 7) и 2-гидроксифенилуксусной кислот (соединение 8) в моче. Кроме того, наблюдается увеличение содержания 4-гидроксифенилпировиноградной и 4-гидроксифенилмолочной кислот [24, 87], по-видимому, в результате ингибирования фермента 4-гидроксифенилпироват-оксидазы [87].

13.3.1.2. Алкаптонурия. Это заболевание также связано с нарушением метаболизма фенилаланина. Им страдает один из 100 000. Оно не приводит к умственной отсталости. Вызывается алкаптонурия снижением активности фермента гомогентизат-оксидазы (рис. 13.6). Признак алкаптонурии — повышенное содержание гомогентизиновой кислоты в моче. Заболевание аминокислотной ацидезией не наблюдается.

13.3.1.3. Кетоацидурия. Причина кетоацидурии — другой дефект метаболизма аминокислот с разветвленной боковой цепью, который приводит к дегенерации мозга и умственной неполно-

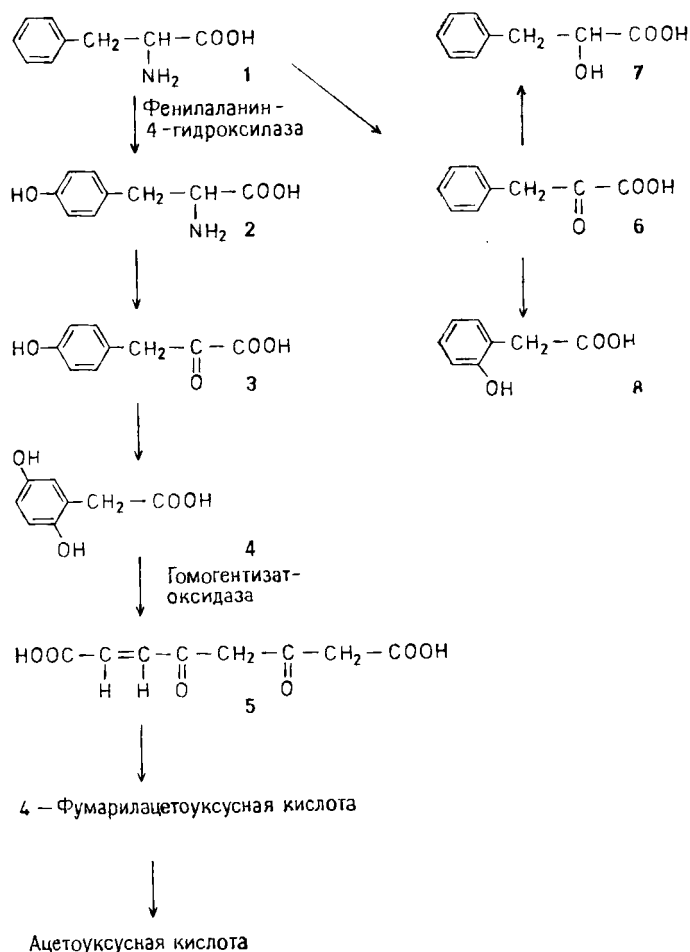


Рис. 13.5. Схема метаболизма фенилаланина.

1 — фенилаланин; 2 — тирозин; 3 — 4-гидроксифенилпировиноградная кислота; 4 — гомогентизовая кислота; 5 — 4-малеилацетоуксусная кислота; 6 — фенилпировиноградная кислота; 7 — фенилмолочная кислота; 8 — 2-гидроксифенилуксусная кислота.

ценности. Нарушение метаболизма вызывается снижением активности фермента, катализирующего окислительное декарбоксилирование α -оксокарбоновых кислот в процессе метаболизма валина (рис. 13.6), лейцина (рис. 13.7) и изолейцина (рис. 13.8). Один из признаков кетонацидурии — повышенное содержание в моче 2-оксокарбоновых кислот и продуктов их восстановления, например 2-оксоизовалериановой и 2-гидроксиизовалериановой кислот (2 и 9, рис. 13.6), 2-оксоизокапроновой и 2-гидроксиизокапроновой кислот (2 и 9 на рис. 13.7),

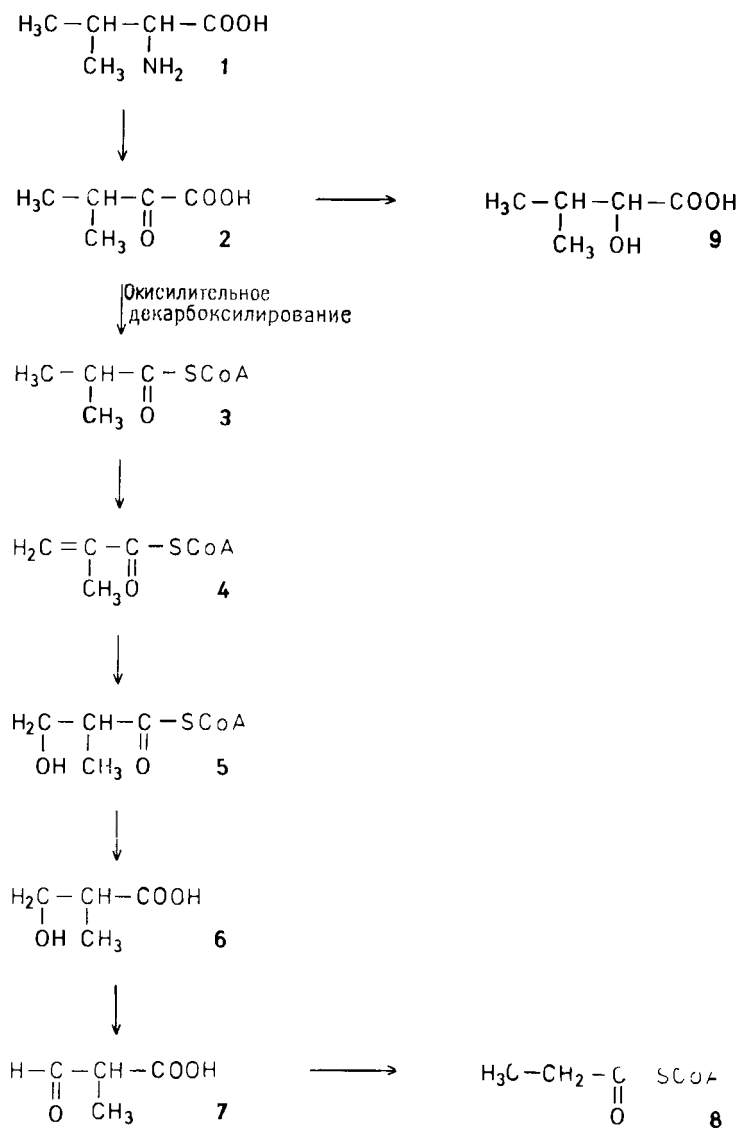


Рис. 13.6. Схема метаболизма валина.

1 — валин; 2 — 2-оксоизовалериановая кислота; 3 — изобутирил-CoA; 4 — метилакрилил-CoA; 5 — 3-гидроксиизобутирил-CoA; 6 — 3-гидроксиизомасляная кислота; 7 — семиальдегид метилмалоновой кислоты; 8 — пропионил-CoA; 9 — 2-гидроксиивалериановая кислота.

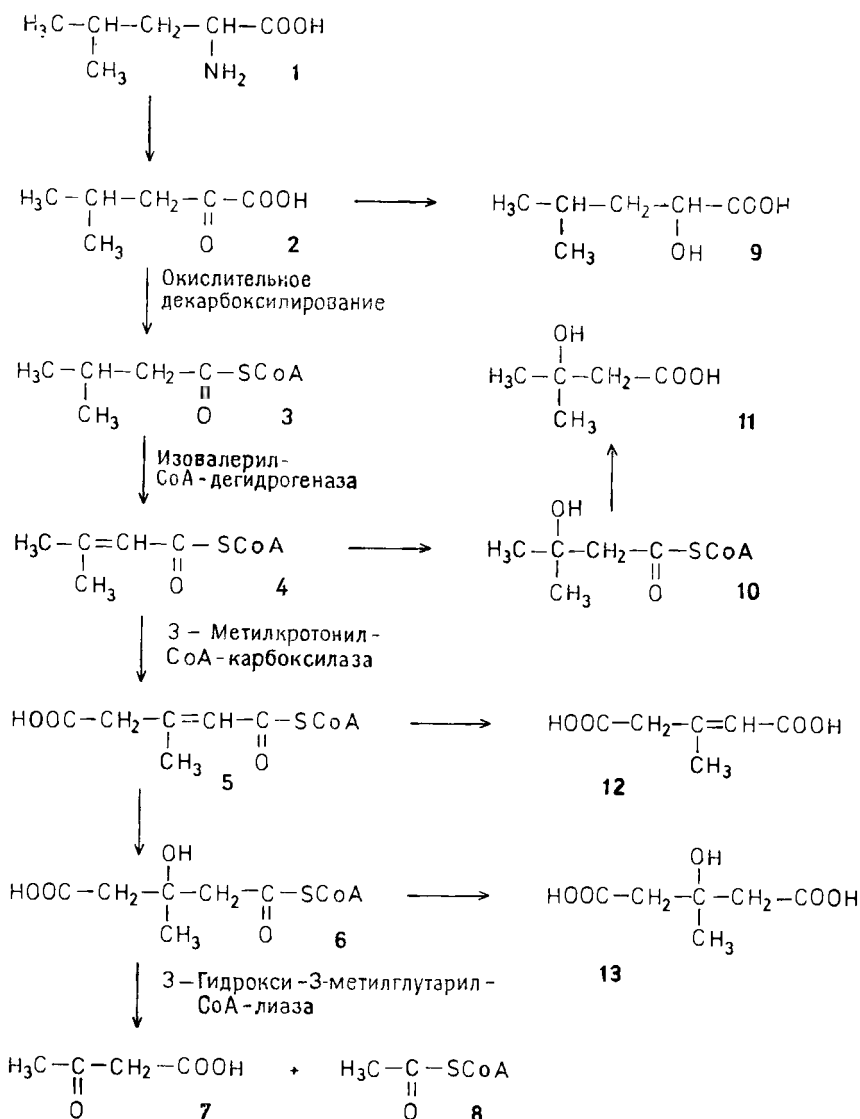
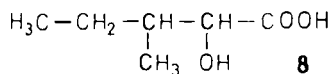
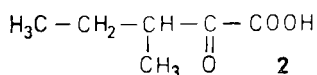
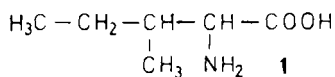


Рис. 13.7. Схема метаболизма лейцина.

1 — лейцин; 2 — 2-оксоизовалерионовая кислота; 3 — изовалерил-CoA; 4 — 3-метилкротонил-CoA; 5 — 3-метилглутаронил-CoA; 6 — 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA; 7 — ацетоуксусная кислота; 8 — ацетил-CoA; 9 — 2-гидроксиизовалерионовая кислота; 10 — 3-гидроксиизовалерил-CoA; 11 — 3-гидроксиизовалерионовая кислота; 12 — 3-метилглутаконовая кислота; 13 — 3-гидрокси-3-метилглутаровая кислота.



↓ Окислительное
декарбоксилирование

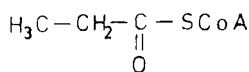
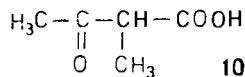
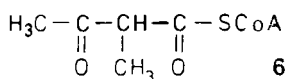
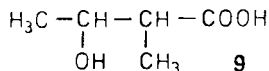
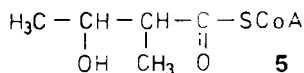
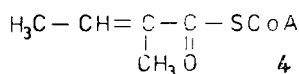
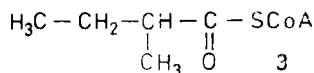


Рис. 13.8. Схема метаболизма изолейцина.

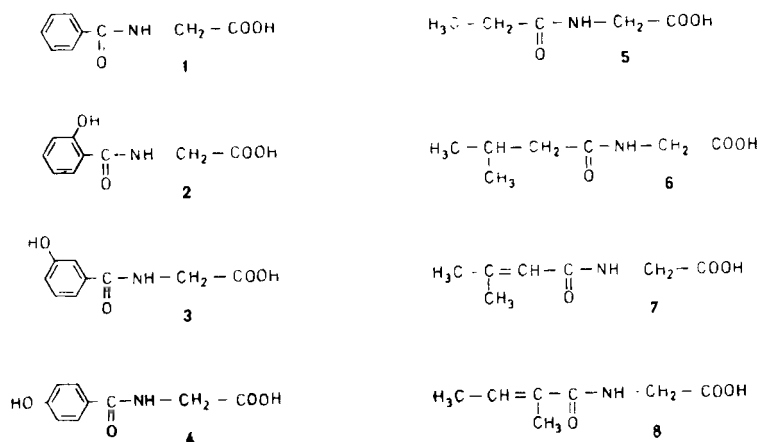
1 — изолейцин; **2** — 2-оксо-3-метилвалериановая кислота; **3** — 2-метилбутирил-CoA; **4** — тиглил-CoA; **5** — 3-гидрокси-2-метилбутирил-CoA; **6** — метилацетоацетил-CoA; **7** — пропионил-CoA; **8** — 2-гидрокси-3-метилвалериановая кислота; **9** — 3-гидрокси-2-метилмасляная кислота; **10** — 2-метилацетоуксусная кислота.

2-оксо-3-метилвалериановой и 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислот (2 и 8, рис. 13.8). Содержание аминокислот валина, лейцина и изолейцина увеличивается и в крови, и моче. Кроме того, в моче наблюдается увеличение содержания и ряда кислых метаболитов, что непосредственно не связано со снижением активности фермента, но характерно для *кетацидозов* вообще [44].

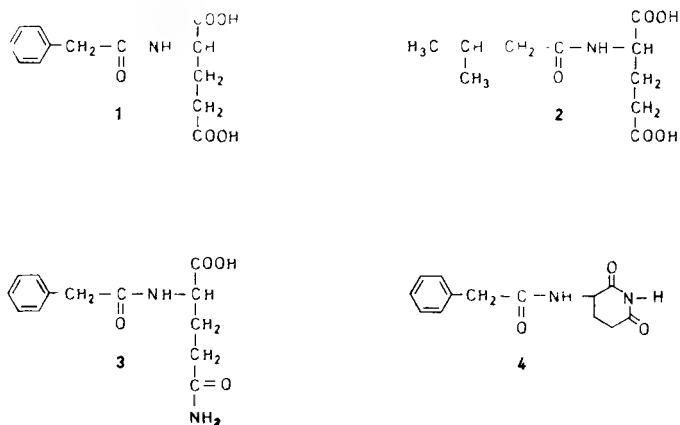
13.3.1.4. 3-Метилкротоноилглицинурия. Изменение метаболизма аминокислот с разветвленной боковой цепью вызывает помимо кетоацидурии еще ряд заболеваний, в том числе 3-метилкротоноилглицинурию, пропионовую ацидемию и метилмалоновую ацидурию. В некоторых случаях пациент может страдать двумя или всеми тремя указанными выше заболеваниями одновременно, причем каждая из них может вызывать умственную отсталость.

Известны по крайней мере два типа 3-метилкротоноилглицинурии. Тип I, биотиннезависимый, вызывается снижением активности фермента метилкротоноил-СоА-карбоксилазы [78, 88], участвующего в метаболизме лейцина (рис. 13.7). Вследствие блокирования действия этого фермента 3-метилкротоноил-СоА (4, рис. 13.7) взаимодействует с глицином с образованием 3-метилкротоноилглицина (7, табл. 13.1). 3-Метилкротоноилглицин относится к классу кислых конъюгатов. Известно, что в моче

Таблица 13.1. Кислые конъюгаты глицинового ряда^a



^a 1 — глиципуровая кислота; 2 — гидроксиглиципуровая кислота; 3 — 3-гидроксиглиципуровая кислота; 4 — 4-гидроксиглиципуровая кислота; 5 — пропионилглицин; 6 — изовалерилглицин; 7 — 3-метилкротоноилглицин; 8 — тиглилглицин.

Таблица 13.2. Кислые конъюгаты глутаминового ряда^a

^a 1 — N-феиилацетилглутаминовая кислота; 2 — N-изовалерилглутаминовая кислота; 3 — N-феиилацетилглутамин; 4 — N-феиилацетилглутаминимид.

существует два типа кислых конъюгатов — глициновые (табл. 13.1) и глутаминовые (табл. 13.2). Кроме увеличения содержания 3-метилкротоноилглицина при заболевании 3-метилкротоноилглицинурией типа I повышается также содержание 3-гидроксиизовалериановой кислоты (11, рис. 13.7), что обусловлено блокированием фермента.

Возникновение 3-метилкротоноилглицинурии типа II (биотинзависимый) [78] обычно сопровождается заболеванием и пропионовой ацидемией [32, 89], и оба заболевания могут быть вызваны одной и той же причиной. Снижение активности фермента холокарбоксилазы-синтетазы, активирующего биотин, приводит к уменьшению активности биотинзависимых ферментов 3-метилкротоноил-СоА-карбоксилазы и пропионил-СоА-карбоксилазы, содержащих биотин как кофактор [89].

13.3.1.5. Пропионовая ацидемия. Причина этого заболевания — недостаточная активность фермента пропионил-СоА-карбоксилазы (рис. 13.9), приводящая к блокированию превращения пропионил-СоА (1, рис. 13.9) (участвующего в метаболизме валина и изолейцина) в метилмалонил-СоА (2, рис. 13.9). В результате этого в сыворотке крови и моче наблюдается повышенное содержание пропионовой кислоты. Характерные метаболиты: пропионилглицин, 3-гидроксипропионовая кислота и некоторые продукты конденсации ацетил-СоА и пропионил-СоА, например 3-оксо-, 3-гидрокси- и 3-оксо-2-метилвалериановые

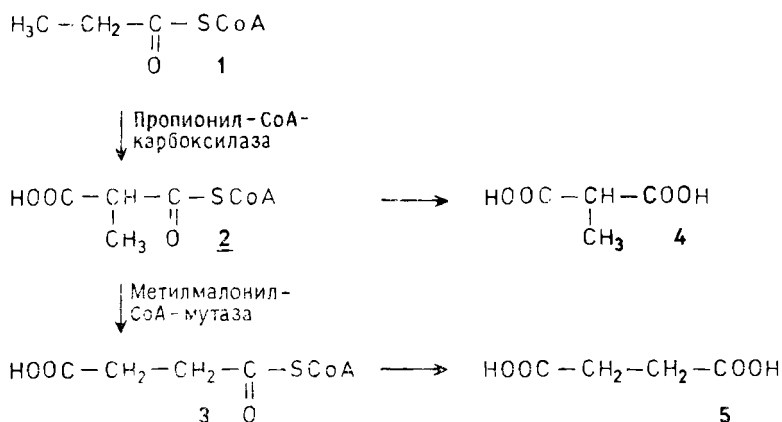


Рис. 13.9. Схема метаболизма пропионил-CoA.

1 — пропионил-CoA; 2 — метилмалонил-CoA; 3 — сукцинил-CoA; 4 — метилмалоновая кислота; 5 — янтарная кислота.

кислоты, 3-оксо-2-метил- и 3-гидрокси-2-метилмасляные кислоты [90, 91]. В работе [32] показано, что, по-видимому, в результате конденсации пропионил-CoA и оксалоуксусной кислоты образуется метиллимонная кислота.

13.3.1.6. Метилмалоновая ацидурия. Причиной заболевания служит блокирование процесса конверсии метилмалонил-CoA в сукцинил-CoA (рис. 13.9), осуществляемого ферментом метилмалонил-CoA-мутазой.

Кофактором этого фермента служит кофермент B_{12} (аденозилкобаламин) — производное витамина B_{12} . Дефицит витамина B_{12} приводит к метилмалоновой ацидурии, но эта приобретенная форма болезни имеет обратимый характер. Однако в некоторых случаях метилмалоновая ацидурия может наблюдаться и у новорожденных или у маленьких детей. Этот тяжелый обменный ацидоз не зависит от дефицита витамина B_{12} . Признаки обеих форм метилмалоновой ацидурии — значительное увеличение содержания в моче метилмалоновой кислоты (4, рис. 13.9) и некоторое повышение уровня 3-гидроксизавалериановой и метиллимонной кислот.

13.3.1.7. Изовалериановая ацидемия. Вызывается врожденным рецессивным дефектом метаболического пути лейцина, обусловленным дефицитом активности фермента изовалерил-CoA-дегидрогеназы (рис. 13.5). Накапливающийся изовалерил-CoA превращается в изовалериановую кислоту, изовалерилглицин (6, табл. 13.1), N-изовалерилглутаминовую кислоту (2,

табл. 13.2), 3- и 4-гидроксивалериановую и 3-гидроксиизогептановую кислоты [94, 95].

13.3.1.8. 3-Гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия. Причина заболевания — уменьшение активности фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-лиазы, катализирующего последнюю стадию метаболического превращения лейцина (рис. 13.7). В результате в моче значительно увеличивается содержание 3-гидрокси-3-метилглутаровой (13, рис. 13.7), 3-метилглутаконовой (12), 3-метилглутаровой и 3-гидроксиизовалериановой (11) кислот [96, 97].

13.3.1.9. Врожденный лактоацидоз. В литературе описано несколько случаев заболевания лактоацидозом со смертельным исходом у новорожденных. Это заболевание, имеющее несколько форм, вызывается дефектом в метаболическом пути β -окисления жирных кислот. Одна из форм обусловлена, по-видимому, уменьшением активности фермента ацил-СоА-дегидрогеназы. Ее признаки — увеличение содержания в моче ненасыщенных дикарбоновых кислот C_6 и высокое содержание молочной кислоты [54, 58]. Другая форма врожденного лактоацидоза связана с дефицитом активности ферментов пируват-дегидрогеназы и пируват-декарбоксилазы [46]. В результате значительно возрастает концентрация молочной и пировиноградной кислот и повышается содержание 2-оксоглутаровой, 2-гидроксиглутаровой, малоновой, фумаровой, янтарной, глицериновой и изолимонной кислот. К врожденному лактоацидозу приводит также снижение активности фруктозо-1,6-дифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы и цитохром-с-оксидазы [46]. Следует отметить, что в нормальных условиях в человеческом организме синтезируется L-молочная кислота, тогда как при врожденном лактоацидозе в моче и спинномозговой жидкости умственно отсталых пациентов обнаружена D-молочная кислота.

13.3.2. Диабетический кетоацидоз

В отличие от врожденных дефектов метаболизма приобретенные дефекты наблюдаются гораздо чаще. Например, возникающими в результате заболевания диабетом нарушениями метаболизма страдает от 1,5 до 2,5% населения [99]. В период декомпенсации диабета у пациента могут развиваться кетоацидозы, признаком которых служит значительное увеличение содержания в сыворотке крови и моче органических кислот в основном четырех следующих групп: жирных и алифатических дикарбоновых, алифатических оксокарбоновых и алифатических гидроксикарбоновых.

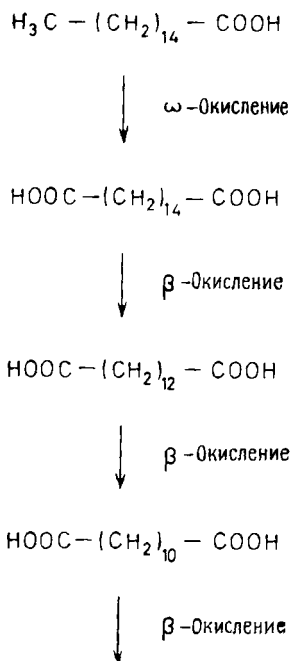


Рис. 13.10. Схема ω -окисления жирных кислот.

13.3.2.1. Жирные кислоты. Увеличение концентрации всего спектра жирных кислот при кетоацидозе происходит вследствие ускорения липолиза, обусловленного уменьшением активности инсулина.

13.3.2.2. Алифатические дикарбоновые кислоты. К числу алифатических дикарбоновых кислот, содержание которых в моче и сыворотке крови резко увеличивается, относятся в первую очередь насыщенные кислоты с четным числом атомов углерода в цепи, например янтарная (C_4), адипиновая (C_6), пробковая (C_8) и себациновая (C_{10}). Дикарбоновые кислоты образуются из длинноцепочечных монокрбонных кислот в результате их последовательного ω - и β -окисления (рис. 13.10). Реакция окисления последнего атома углерода длинноцепочечной жирной кислоты, получившая название реакции ω -окисления, известна с 1934 г. [100]. Механизм образования жирных кислот с меньшей

углеродной цепью подтвердили исследования метаболизма ^{14}C -меченой пальмитиновой кислоты [101]. В организме здорового человека роль ω -окисления жирных кислот в процессе их метаболизма мала. При кетоацидозе она становится заметной, по-видимому, вследствие изменения механизма на обратный. Как показали эксперименты, проведенные на кетозных крысах, метаболизм от 5 до 20% жирных кислот начинается с ω -окисления [102, 103].

Дикарбоновые кислоты, имеющие боковые метильные группы, например метилянтарная, метилглутаровая, метиладипиновая, метилпимелиновая, метилпробковая, а также некоторые кислоты, имеющие этильные группы, при ацидозах изменениям практически не подвергаются. Авторы работы [104] предположили, что эти кислоты образуются в желудочно-кишечном тракте в результате ω -окисления 3-метил- или антеизометилмонокрбонных кислот.

Ненасыщенные дикарбоновые кислоты, особенно мезаконовая (*транс*-метилбутендиоевая) и цитраконовая (*цис*-метилбутендиоевая) кислоты и два *цис*—*транс*-изомера 3-метилглутаконовой кислоты [26], не подвергаются воздействию при кетоацидозах.

Содержание янтарной кислоты в биологических жидкостях достигает максимума на 2—4 сут позднее, чем других насыщенных дикарбоновых кислот. Следует предположить поэтому, что янтарная кислота образуется не из длинноцепочечных жирных кислот с четным числом атомов углерода, а скорее из пропионил-СоА (рис. 13.9), который в свою очередь образуется из жирных кислот с нечетным числом атомов углерода и из аминокислот валина и изолейцина.

Следует отметить, что содержание насыщенных и ненасыщенных дикарбоновых кислот в сыворотке крови значительно меньше, чем в моче.

13.3.2.3. Алифатические оксокарбоновые кислоты. Кислоты этой группы образуются в результате кетогенеза или трансаминирования аминокислот. При заболевании кетоацидозами процесс кетогенеза (рис. 13.11) значительно интенсифицируется. Однако при диабетах и особенно при кетоацидозах повышается уровень валина, лейцина и изолейцина, а также их метаболитов [105, 106], что в ряде случаев приводит к существенному увеличению содержания в моче и крови ацетоуксусной кислоты и в меньшей степени 2-оксоизовалериановой (1, рис. 13.6), 2-оксоизокапроновой (2, рис. 13.7) и 2-оксо-3-метилвалериановой (2, рис. 13.8) кислот.

Если оксокарбоновые кислоты затем анализируют в виде метил-О-метилоксимовых производных, содержащих азот, то концентрацию их можно селективно контролировать, используя азот-селективные детекторы, например селективные термоионные детекторы (рис. 13.12). В определенных условиях такие производные можно получать в виде *син*- и *анти*-изомеров. В работе [36] приведены данные по хроматографическому разделению оксокарбоновых кислот, содержащихся в крови и моче здоровых людей, больных диабетом, находящихся под тщательным терапевтическим контролем, и пациентов с кетоацидозом.

13.3.2.4. Алифатические гидроксикарбоновые кислоты. Как было отмечено выше, при кетоацидозах усиливается образование метаболитов аминокислот с разветвленными цепями. Из валина образуются 3-гидроксиизомасляная и 2-гидроксиизовалериановая кислоты (6 и 9, рис. 13.6) из лейцина — 3-гидрокси-валериановая и 2-гидроксиизокапроновая кислоты (11 и 9, рис. 13.7), а из изолейцина — 3-гидрокси-2-метилмасляная и 2-гидрокси-3-метилвалериановая кислоты (9 и 8, рис. 13.8). При многих кетоацидозах содержание этих продуктов метаболизма в биологических жидкостях увеличивается [56, 107, 108]. В наиболее значительной степени — повышается концентрация гидроксикарбоновых кислот, в частности 3-гидрокси-масляной кислоты, образующейся в результате восстановления ацетоуксусной

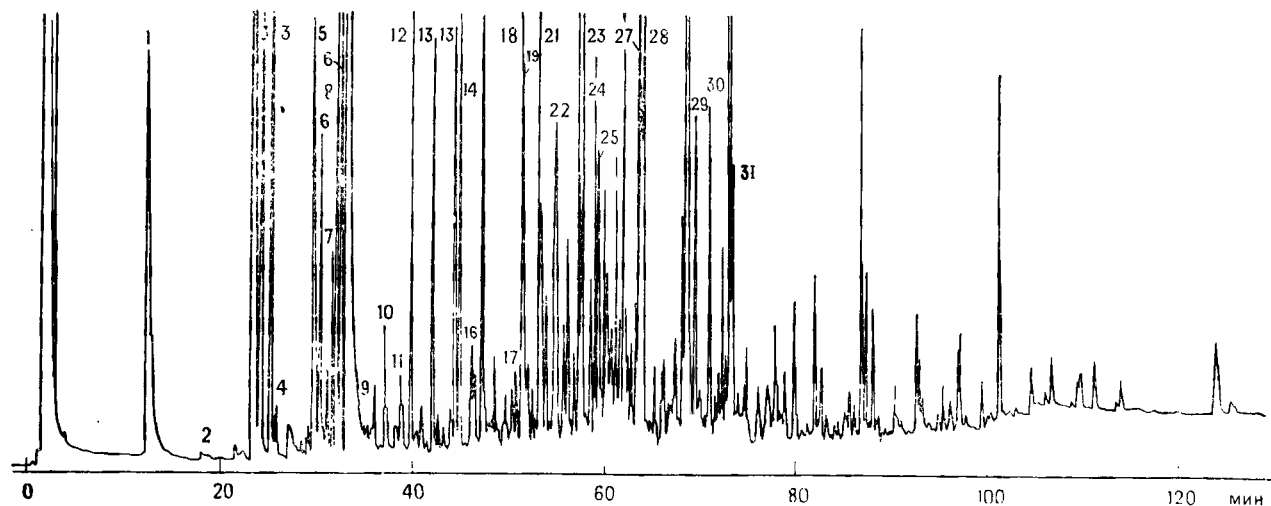


Рис. 13.11. Хроматограмма фракции 2 органических кислот, содержащихся в моче больных кетоацидозом, полученная методом ГХ.

Колонка: стеклянная капиллярная, 25 м; неподвижная фаза: OV-17; обнаружение: масс-спектрометрическое.
 1 — 3-гидроксимасляная; 2 — пировиноградная; 3 — 3-оксомасляная; 4 — 2-оксоизовалериановая; 5 — янтарная; 6 — 2-оксоизокапроновая; 7 — 2-оксо-3-метилвалериановая; 8 — метилянтарная; 9 — цитраконовая; 10 — глутаровая; 11 — метилглутаровая; 12 — фенилуксусная; 13 — 3-метилглутаконовая; 14 — адипиновая; 15 — фенилпропионовая; 16 — 3-метил-адипиновая; 17 — гептендиовая; 18 — пимелиновая; 19 — пимелиновая; 20 — гидроксibenзойная; 21 — антраиловая; 22 — гидроксibenзойная; 23 — пробковая; 24 — гидроксифенилуксусная; 25 — 3-метилпробковая; 26 — дигидроксibenзойная; 27 — фенилпировиноградная; 28 — азелаиновая; 29 — себаценовая; 30 — дигидроксibenзойная; 31 — 3-карбокси-4-метил-5-пропил-2-фуранпропионовая кислоты.

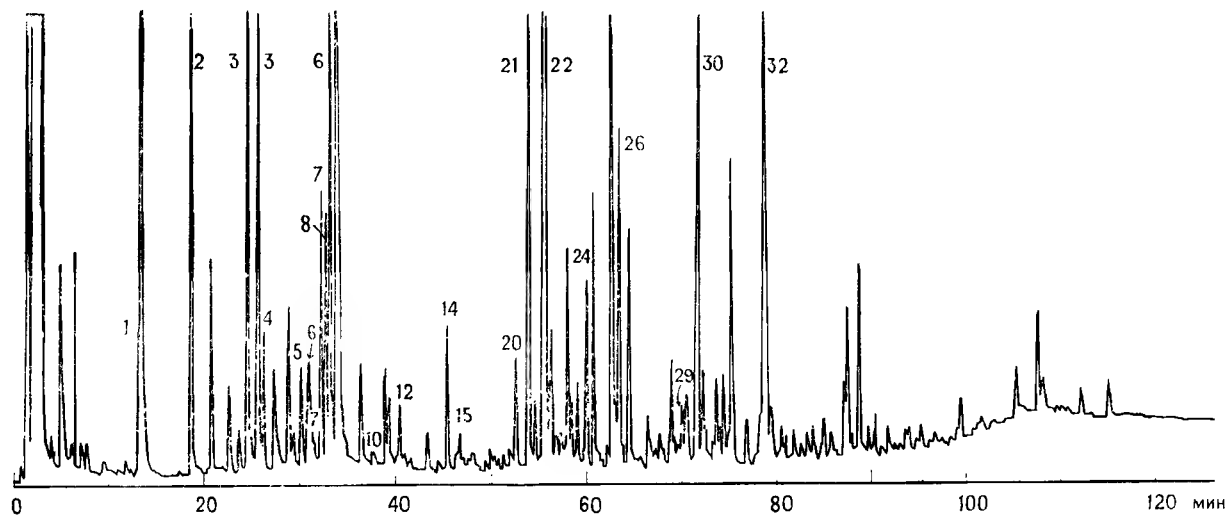


Рис. 13.12. Хроматограмма фракции 2 органических кислот, содержащихся в крови больных кетоацидозом, полученная методом ГХ (те же пациенты, хроматографический анализ мочи которых представлен на рис. 13.11; нумерация пиков та же, что на рис. 13.11).

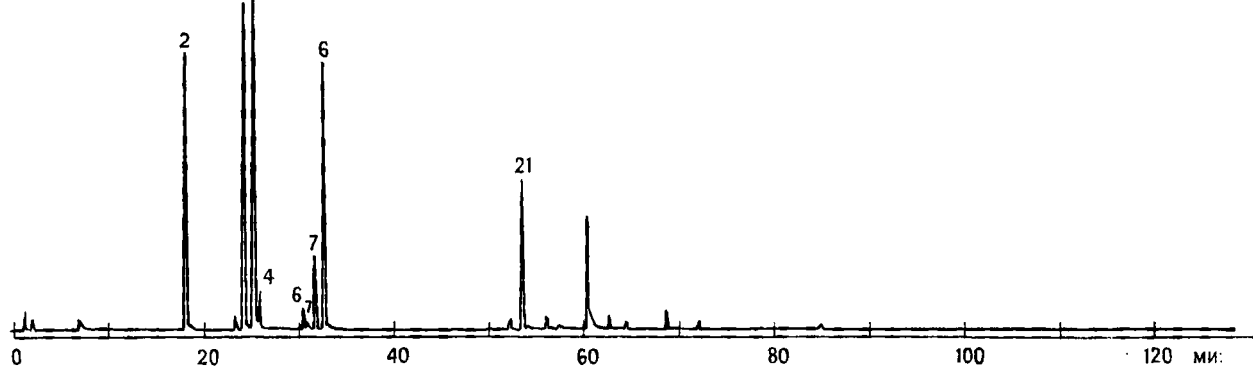


Рис. 13.14. Хроматограмма метил-О-метилоксимовых производных органических кислот, содержащихся во фракции 2 крови больных кетоацидурией, полученная методом ГХ.

Детектор: термолонный.

2 — пировиноградная; 3 — 3-оксомасляная; 4 — 2-оксоизовалериановая; 6 — 2-оксоизокапроновая; 7 — 2-оксо-3-метилвалериановая; 21 — антрилиловая кислоты.

кислоты в процессе кетогенеза (рис. 13.11). Кроме того, в моче повышается концентрация ряда 3-гидроксидикарбоновых кислот, очевидно в результате сочетания ω -окисления и неполного β -окисления жирных кислот [21].

13.3.3. Заболевания, вызываемые катехоламином, серотонином и их метаболитами

Ряд заболеваний самого разного характера связан с катехоламинами, серотонином и их метаболитами. Изменение концентрации данных соединений служит признаком этих заболеваний и может быть использовано для их диагностики. Биохимический синтез катехоламинов из L-тирозина осуществляется в адреноэргических нейтронах центральной и вегетативной нервной системы и хромаффинных клетках мозгового вещества надпочечников. Серотонин содержится в энтерохромаффинных клетках кишечника. Катехоламины и серотонин выполняют ряд биохимических функций, одна из которых обусловлена тем, что они являются нейромедиаторами.

Определение биогенных аминов и их метаболитов (рис. 13.15 и 13.16) позволяет диагностировать ряд депрессивных психотических и неврологических нарушений. Известно также [109], что в крови у умственно отсталых детей увеличивается содержание серотонина и его метаболита 5-гидроксиндолил-3-уксусной кислоты (5, рис. 13.16). Кроме того, определение концентрации катехоламинов и их метаболитов играет важную роль в диагностике опухолевых заболеваний, сопровождающихся выделением катехоламинов, возникающих в результате перенапряжения (таких, например, как феохромоцитома). Увеличение содержания 5-гидроксиндолил-3-уксусной кислоты в моче свидетельствует о наличии у больного раковой опухоли.

Среди кислых метаболитов катехоламина наиболее часто в диагностических целях определяют ванилилминдальную (14, рис. 13.15), ванилиновую (10), гомованилиновую (9) и 3,4-дигидроксифенилуксусную (9) кислоты. Из числа некислотных метаболитов катехоламина чаще всего определяют 3-метокси-4-гидроксифенилгликоль (15, рис. 13.15) [8, 17, 19, 48, 67—69, 71, 110]. Определение метаболитов осуществляют при помощи ВЭЖХ или ГХ, обнаружение — на основании данных масс-спектрометрии.

Сами биогенные амины или их предшественники аминокислоты можно определять вместе с кислотами, особенно если для этого используется ВЭЖХ. Так, содержание одного из метаболитов серотонина 5-гидроксиндолил-3-уксусной кислоты, контроль за которым осуществляют чаще всего, измеряют вместе с содержанием серотонина [7, 20, 66, 72, 109].

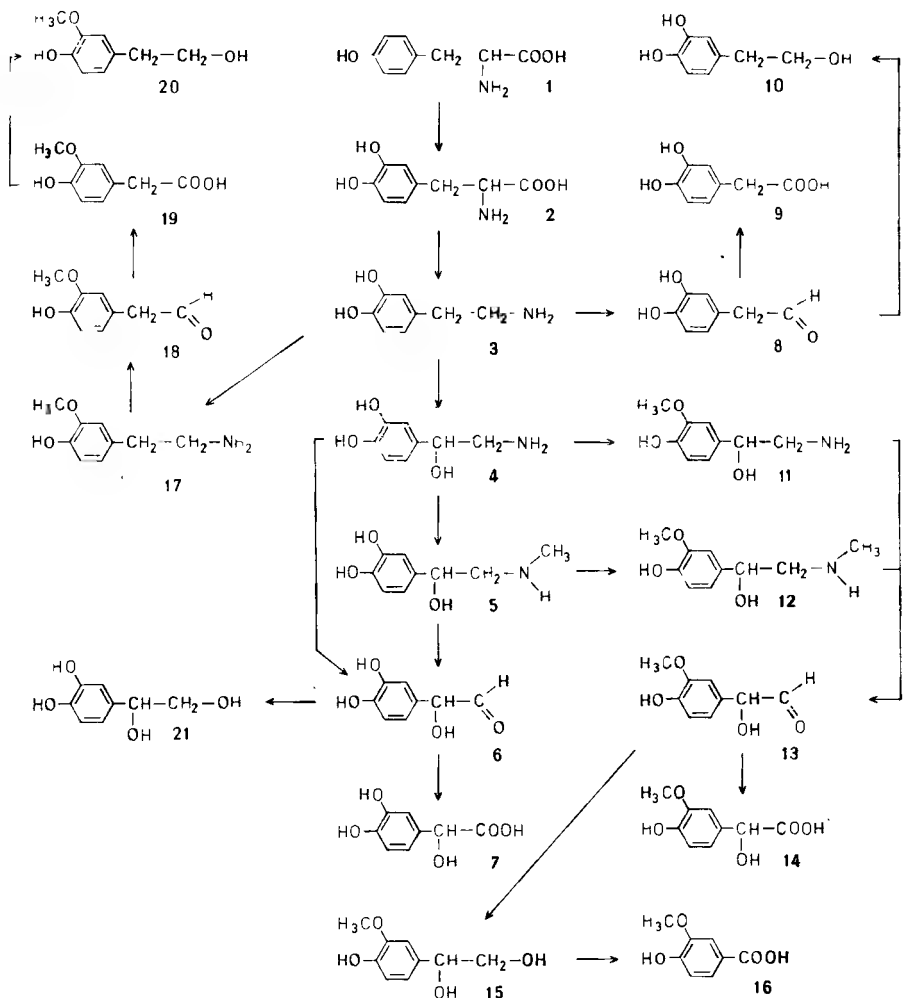


Рис. 13.15. Схема метаболизма биогенных аминов тирозинового ряда.

1 — тирозин; 2 — 3,4-дигидроксифенилаланин (дофа); 3 — дофамин; 4 — норадrenalин; 5 — адреналин; 6 — 3,4-дигидроксифенилглицольальдегид; 7 — 3,4-дигидроксиминдальная кислота; 8 — 3,4-дигидроксифенилацетальдегид; 9 — 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 10 — 3,4-дигидроксифенилэтанол; 11 — норметанефрин; 12 — метанефрин; 13 — 3-метокси-4-гидроксифенилглицольальдегид; 14 — 3-метокси-4-гидроксиминдальная кислота (ванилминдальная кислота); 15 — 3-метокси-4-гидроксифенилглицоль; 16 — ванилиновая кислота; 17 — метокситирамин; 18 — 3-метокси-4-гидроксифенилацетальдегид; 19 — 3-метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота (гомованилиновая кислота); 20 — 3-метокси-4-гидроксифенилэтанол; 21 — 3,4-дигидроксифенилглицоль.

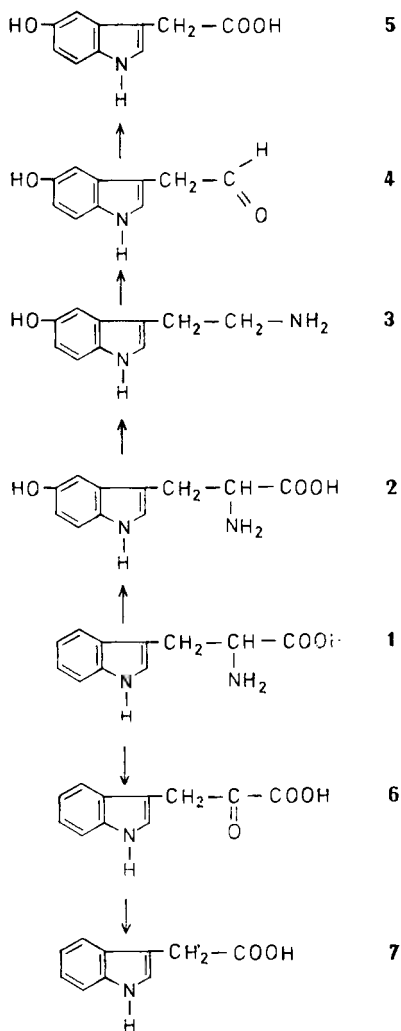


Рис. 13.16. Схема метаболизма биогенных аминов триптофанового ряда.

1 — триптофан; 2 — 5-гидроксириптофан; 3 — 5-гидроксириптамин (серотонин); 4 — 5-гидроксииндолил-3-ацетальдегид; 5 — 5-гидроксииндолил-3-уксусная кислота; 6 — индолил-3-пировиноградная кислота; 7 — индолил-3-уксусная кислота.

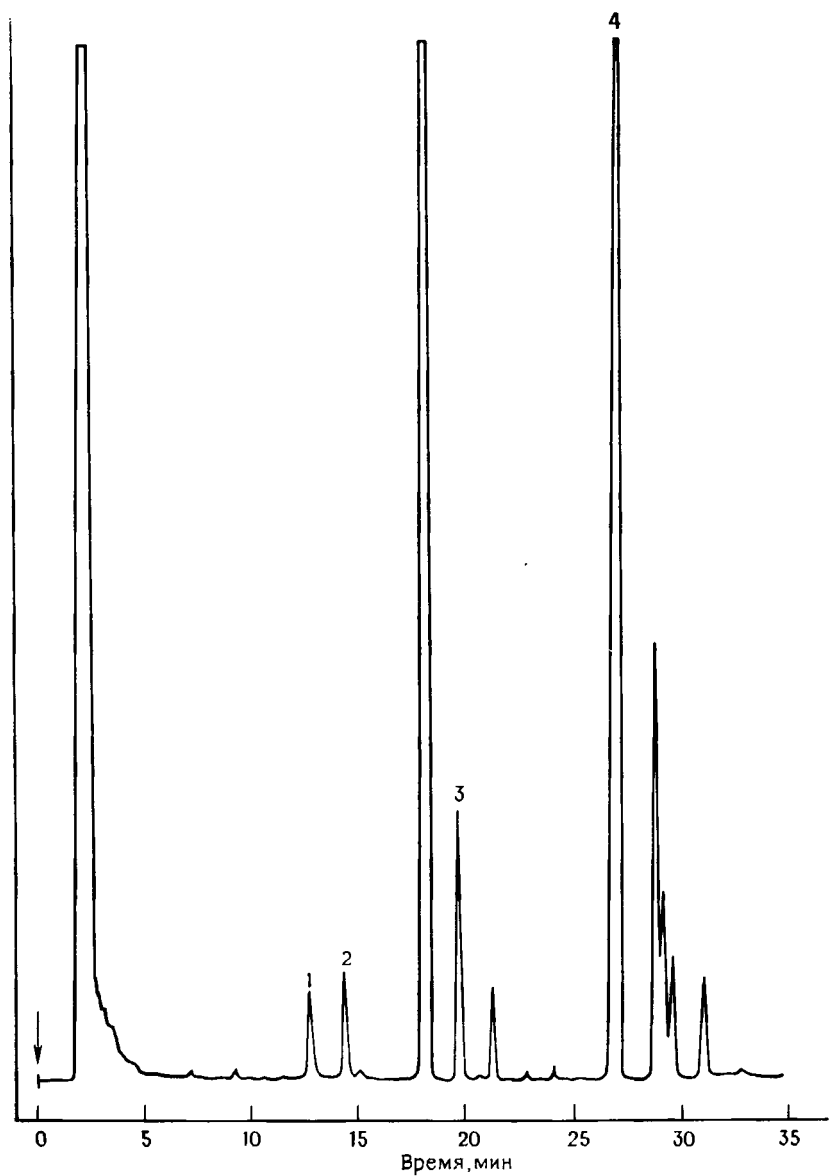


Рис. 13.17. Хроматограмма этилацетатного экстракта спинномозговой жидкости человека, полученная методом ВЭЖХ [71].

Колонка: 250×4,6 мм (внутр. диаметр); неподвижная фаза: ультрасфер ODS, 5 мкм.
1 — ванилминдальная кислота; 2 — 3-метокси-4-гидроксиминдальная кислота; 3 — депак; 4 — гидроксиванилиновая кислота.

Литература

1. Gawehn K., Bergmeyer H. U., in: Bergmeyer H. U. (Ed.): Methoden der enzymatischen Analyse, p. 1538. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
2. Williamson D. H., Mellanby J., Krebs H. A. Biochem. J., **82**, 90 (1962).
3. Rice E. W., Gorgan B. S. Clin. Chem., **8**, 181 (1962).
4. Kageyama N. Clin. Chim. Acta, **31**, 421 (1971).
5. Bickel H. Disch Med. Wschr., **88**, 1850 (1963).
6. Astier A., Deutsch A. M., J. Chromatogr., **182**, 88 (1980).
7. Wahlund K.-G., Edlen B. Clin. Chim. Acta, **110**, 71 (1981).
8. Anderson G. M., Young J. G., Cohen D. J. J. Chromatogr., **164**, 501 (1979).
9. Rosano T. R., Brown H. H., Meola J. M., Clin. Chem., **27**, 228 (1981).
10. Seta K., Washitake M., Armo T., Takai N., Okuyama T. J. Chromatogr., **181**, 311 (1980).
11. Seta K., Washitake M., Tanaka I., Takai N., Okuyama T. J. Chromatogr., **221**, 215 (1980).
12. Dragnac P. S., Steindel S. J., Trawick W. G. Clin. Chem., **26**, 910 (1980).
13. Pettersen J. E., Jellum E., Eldjarn. Clin. Chim. Acta, **38**, 17 (1972).
14. Pettersen J. E., Jellum E. Clin. Chim. Acta, **41**, 199 (1972).
15. Jellum E., Stokke O., Eldjarn L. Clin. Chem., **18**, 800 (1972).
16. Tracy P. P., Wold L. E., Jones J. D., Burritt M. F. Clin. Chem., **27**, 160 (1981).
17. Yoshida A., Yoshioka M., Sakai T., Tamura Z. J. Chromatogr., **227**, 162 (1982).
18. Molnar I., Horvath C. J. Chromatogr., **143**, 391 (1977).
19. Joseph M. H., Kadam B. V., Risby D. J. Chromatogr., **226**, 361 (1981).
20. Beck O., Palmkog G., Hultman E. Clin. Chim. Acta, **79**, 149 (1977).
21. Greter J., Lindstedt S., Seeman H., Steen G. Clin. Chem., **26**, 261 (1980).
22. Niwa T., Ohki T., Maeda K., Saito A., Kobayashi K. Clin. Chim. Acta, **99**, 71 (1979).
23. Sternowsky H. J., Roboz J., Hutterer F., Gaull G. Clin. Chim. Acta, **47**, 371 (1973).
24. Tanaka K., West-Dull A., Hine D. G., Lynn T. B., Lowe T. Clin. Chem., **26**, 1847 (1980).
25. Fitch W. L., Anderson P. J., Smith D. H. J. Chromatogr., **162**, 249 (1979).
26. Liebich H. M., Pickert A., Stierle U., Wöll J. J. Chromatogr., **199**, 181 (1980).
27. Nissen S. N., von Huysen C., Haymond M. W. J. Chromatogr., **232**, 170 (1982).
28. Shihabi Z. K., Scako J. Clin. Chem., **26**, 907 (1980).
29. Voelter W., Huber R., Zech K., in: A. Zlatkis, R. Segura, L. S. Ettre (eds.) Advances in Chromatography 1981, p. 529. Elsevier Scientific Publishing Company 1981.
30. Hirata T., Kai M., Kohashi K., Okura Y. J. Chromatogr., **226**, 25 (1981).
31. Chalmers R. A., Watts R. W. E. Analyst, **97**, 958 (1972).
32. Chalmers R. A., Lawson A. M., Watts R. W. E. Clin. Chim. Acta, **52**, 43 (1974).
33. Gates S. C., Dendramis N., Sweeley C. C. Clin. Chem., **24**, 1674 (1978).
34. Lawson A. M., Chalmers R. A., Watts R. W. Clin. Chem., **22**, 1283 (1976).
35. Patterson J. L., Brown R. P. J. Chromatogr., **182**, 425 (1980).
36. Liebich H. M., Pickert A., Wöll J. J. Chromatogr., **217**, 255 (1981).
37. Spiteller M., Spiteller G. J. Chromatogr., **164**, 243 (1979).
38. Sims P., Truscott R., Halpern B. J. Chromatogr., **222**, 337 (1981).
39. Pinkston D., Spiteller G., von Hanning H., Matthaei D. J. Chromatogr., **223**, 1 (1981).
40. Hayashi T., Sugiura T., Tereda H., Kawai S., Ohno T. J. Chromatogr., **118**, 403 (1976).
41. Tereda H., Hayashi T., Kawai S., Ohno T. J. Chromatogr., **130**, 281 (1977).

42. Hayashi T., Todoriki H., Narzse H. J. Chromatogr., **224**, 197 (1981).
43. Dinges W. Anal. Chem., **49**, 442 (1977).
44. Jakobs C., Solem E., Halvorsen Ek. K., Jellum E. J. Chromatogr., **143**, 31, (1977).
45. Björkman L., McLean C., Steen G. Clin. Chem., **22**, 49 (1976).
46. Chalmers R. A., Lawson A. M., Borud O. Clin. Chim. Acta, **77**, 117 (1977).
47. Greter J., Lindsted S., Seeman H., Steen G. Clin. Chem., **26**, 261 (1980).
48. Narasimachari N., Leiner K., Brown C. Clin. Chim. Acta, **62**, 245 (1975).
49. Niwa T., Maeda K., Ohki T., Sakakibara J. J. Chromatogr., **228**, 59 (1982).
50. Bulltude F. W., Newham S. L. Clin. Chem., **21**, 1329 (1975).
51. Dosman J., Crawhall L. C., Klasssen G. A., Mamer O. A., Neumann P. Clin. Chim. Acta, **51**, 93 (1974).
52. Duran M., Ketling D., Wadman S. K., Jakobs C., Schutgens R. B. H., Veder H. A. Clin. Chim. Acta, **90**, 187 (1978).
53. Tanaka K., Hine D. G., West-Dull A., Lynn T. B. Clin. Chem., **26**, 1839 (1980).
54. Borg L., Lindstedt S., Steen G. Clin. Chim. Acta, **41**, 363 (1972).
55. Grupe A., Spiteller G. J. Chromatogr., **226**, 301 (1981).
56. Landaas S. Clin. Chim. Acta, **54**, 39 (1974).
57. Lehnert W., Schuchmann L., Urbanek R., Niederhoff H., Böh N. Eur. J. Pediatr., **128**, 197 (1978).
58. Lindstedt S., Norberg K., Steen G., Wahl E. Clin. Chem., **22**, 1330 (1976).
59. Sjöquist B., Lindström B., Ångaard E. Life Sci., **13**, 1655 (1973).
60. Chauhan J., Darbre A. J. Chromatogr., **183**, 391 (1980).
61. Takahashi S., Yoshioka M., Yoshiue S., Tamura Z. J. Chromatogr., **145**, 1 (1978).
62. Davis B. A., Baulton A. A. J. Chromatogr., **222**, 161 (1981).
63. Chalmers R. A., Watts R. W. E. Analyst, **97**, 951 (1972).
64. Langenbeck U., Hoinowski A., Mantel K., Möhring H.-U. J. Chromatogr., **143**, 39 (1977).
65. Langenbeck U., Mench-Hoinowski A., Dieckmann K.-P., Möhring H.-U., Petersen J. Chromatogr., **145**, 185 (1978).
66. Yoshida A., Yamazaki T., Sakai T. Clin. Chim. Acta, **77**, 95 (1977).
67. Ghebrezabher M., Rufini S., Castellucci M. G., Lato M. J. Chromatogr., **222**, 191 (1981).
68. Bertani-Dziedzic L. M., Krstulovic A. M., Ciriello S., Gillow S. E. J. Chromatogr., **164**, 345 (1979).
69. Mitchell J., Goscia C. J. J. Chromatogr., **145**, 295 (1978).
70. Fornstedt N. J. Chromatogr., **225**, 440 (1981).
71. Krstulovic A. M., Bertani-Dziedzic L., Baustista-Cerqueira S., Gitlow S. E. J. Chromatogr., **227**, 379 (1982).
72. Koch D. D., Kissinger P. J. Chromatogr., **164**, 441 (1979).
73. Krstulovic A. M., Matzura C. J. Chromatogr., **163**, 72 (1979).
74. Nagatsu T., Oka K., Katsu T. J. Chromatogr., **163**, 247 (1979).
75. Hausen A., Fuchs D., König K., Wachter H. Clin. Chem., **27**, 1455 (1981).
76. Morrison H., Avnir D., Zarella T. J. Chromatogr., **183**, 83 (1980).
77. Senftleber F. C., Halline A. G., Veening H., Dayton D. A. Clin. Chem., **22**, 1522 (1976).
78. Jellum E. J. Chromatogr., **143**, 427 (1977).
79. Jakobs C., Bojasch M., Duran M., Ketling D., Wadman S. K., Leupold D. Clin. Chim. Acta, **106**, 85 (1980).
80. Ende M., Pfeifer P., Spiteller G. J. Chromatogr., **183**, 1 (1980).
81. Knights B. A., Legendre M., Laseter J. L., Storer J. S. Clin. Chem., **21**, 888 (1975).
82. Heininger J., Munthe E., Pahle J., Jellum E. in: Advances in Chromatography, 1978, p. 297. Elsevier Scientific Publishing Company, 1978.
83. Jellum E., Storseth P., Alexander J., Helland P., Stokke O., Teig E. J. Chromatogr., **126**, 487 (1976).

84. *Chalmers R. A., Healy M. J. R., Lawson A. M., Watts R. W. E.* Clin. Chem., **22**, 1288 (1976).
85. *Chalmers R. A., Lawson A. M.* Chem. Britain, **11**, 290 (1975).
86. *Watts R. W. E., Chalmers R. A., Lawson A. M.* Lancet, **1**, 368 (1975).
87. *Chalmers R. A., Watts R. W. E.* Clin. Chim. Acta, **55**, 281 (1974).
88. *Eldjarn L., Jellum E., Stokke O., Pande H., Waaler P. E.* Lancet, **11**, 521 (1970).
89. *Weyler W., Sweetman L., Maggio D. C., Nyhan W. L.* Clin. Chim. Acta, **76**, 321 (1977).
90. *Lehnert W., Junker A.* Clin. Chim. Acta, **104**, 47 (1980).
91. *Gretner J., Lindstedt S., Seeman H., Steen G.* Clin. Chim. Acta, **106**, 103 (1980).
92. *Rosenberg J. E., Lilljeqvist A.-Ch., Hsia Y. E. N.* Engl. J. Med., **24**, 1319 (1968).
93. *Goodman S. E., McCabe E. R. B., Fennessey P. V., Miles B. S., Mace J. W., Jellum E.* Clin. Chim. Acta, **87**, 441 (1978).
94. *Lhnert W.* Clin. Chim. Acta, **113**, 101 (1981).
95. *Lehnert W.* Clin. Chim. Acta, **116**, 249 (1981).
96. *Norman E. J., Denton M. D., Berry H. K.* Clin. Chem., **28**, 137 (1982).
97. *Truscott R. J. W., Halpern B., Wysocki S. J., Hähnel R., Wülcken B.* Clin. Chim. Acta, **95**, 11 (1979).
98. *Duran M., van Bieruliet J. P. G. M., Kamerling J. P., Wadman S. K.* Clin. Chim. Acta, **74**, 297 (1977).
99. *Deutsch E., Geyer G.* Laboratoriumsdiagnostik, p. 698, Verlag Brüder Hartmann, Berlin, 1975.
100. *Verkade P. E., van der Lee J.* Biochem. J., **28**, 31 (1934).
101. *Pettersen J. E.* Clin. Chim. Acta, **41**, 231 (1972).
102. *Björkhem I. J.* Lipid. Res., **19**, 585 (1978).
103. *Kam W., Kumaran K., Landau B. R. J.* Lipid Res., **19**, 591 (1978).
104. *Pettersen J. E., Stokke O.* Biochim. Biophys. Acta, **304**, 316 (1973).
105. *Felig P., Marliss E., Ohman J. L., Cahill G. F.* Diabetes, **19**, 727 (1970).
106. *Paul H. S., Adibi S. A.* Metabolism, **27**, 185 (1978).
107. *Landaas S.* Clin. Chim. Acta, **64**, 143 (1975).
108. *Landaas S., Jakobs C.* Clin. Chim. Acta, **78**, 489 (1977).
109. *Hanley H. G., Stahl S. M., Freedman D. X.* Arch. Gen. Psychiatry, **34**, 521 (1977).
110. *Muskiet F. A. J., Fremouw-Ottevangers D. C., Nagel G. T., Wolthers B. G. de Vries J. A.* Clin. Chem., **24**, 2001 (1978).

Вторичные растительные метаболиты

К. Хостетман, М. Хостетман

(K. Hostettmann, M. Hostettmann)

14.1. Введение

В настоящее время можно считать доказанным, что высокоэффективная жидкостная хроматография — один из наиболее важных методов разделения таких сложных смесей, как растительные экстракты и другие биологические материалы. ВЭЖХ открывает широкие возможности перед всеми химиками, занимающимися изучением природных продуктов. Благодаря высокой скорости и высокой эффективности этот метод позволяет разделять и выделять лабильные химические соединения, входящие в состав растений, соединения с близкими свойствами и многочисленные изомеры. ВЭЖХ стала рутинным методом количественного анализа и стандартизации многих лекарственных средств.

В последние годы опубликовано очень большое число работ, посвященных применению ВЭЖХ для разделения природных продуктов. Однако эти публикации рассеяны по многочисленным журналам, и часто исследователю трудно отыскать подходящие условия для какого-либо конкретного случая. Кингстон [1] опубликовал очень хороший и полезный обзор данных, опубликованных за период с 1974 по 1978 г., посвященных разделению при помощи ВЭЖХ вторичных растительных метаболитов. Некоторые примеры разделения соединений растительного происхождения приведены в статье [2].

Хотя в настоящее время хроматографисты располагают большим количеством новых типов неподвижных фаз, разделение вторичных растительных метаболитов чаще всего проводят на неподвижных фазах с химически привитыми октадецилильными группами. По оценке, проведенной в 1978 г. [3]. C_{18} -фазы используются в восьмидесяти процентов случаев.

В этой главе будут рассмотрены данные, опубликованные после появления обзора Кингстона, касающиеся разделения при помощи ВЭЖХ соединений, относящихся к различным классам вторичных растительных метаболитов. Следует отметить, что число публикаций по указанной тематике так велико, а круг соединений этого класса столь широк, что охватить весь матери-

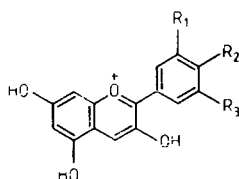
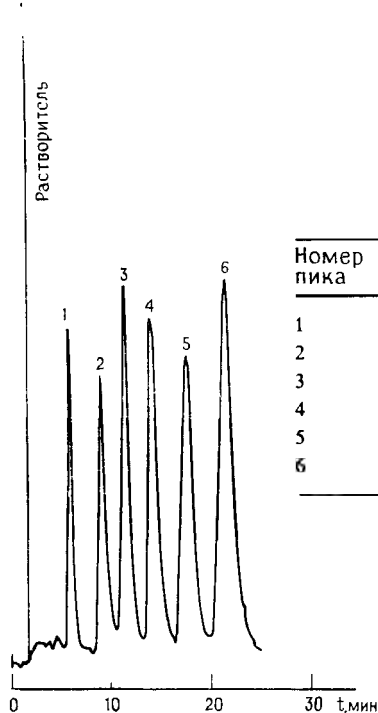
ал просто не представляется возможным. Специально отобранные типичные примеры помогут правильно выбрать условия для решения конкретных хроматографических задач.

14.2. Растительные фенольные соединения

Общеизвестно, что ВЭЖХ используется в химии растительных фенольных соединений главным образом как аналитический метод, например с целью количественного определения, оценки степени чистоты выделенных соединений, хемотаксономического сравнения и т. д. Возможности ВЭЖХ как препаративного метода выделения фенолов применяются не в полной мере. В обзорах [4, 5] рассматривается в основном разделение флавоноидов. Полярные агликоны и гликозиды во многих случаях удается успешно разделить методом обращенно-фазовой хроматографии на ODS-фазах при элюировании смесью метанол/уксусная кислота/вода или метанол/фосфорная кислота/вода. Сложные смеси высокополярных фенолов были разделены также при помощи ион-парной хроматографии [6, 7]. Альтернативный метод разделения полярных соединений, предложенный автором работы [8], основан на применении забуференного силикагеля. Этим методом были разделены кислоты, входящие в состав пива и придающие ему горьковатый привкус [7, 8].

14.2.1. Флавоноидные агликоны

Разделение на силикагелевых неподвижных фазах проводится, как правило, нечасто, однако эти неподвижные фазы хорошо подходят для разделения неполярных или слабополярных флавоноидных агликонов. Эффективное разделение наиболее важных цитрусовых полиметоксилированных флавонов было осуществлено на лихосорбе Si 60 при элюировании смесью *n*-гептан/изопропанол (60 : 40) [9]. Тангеретин, тетра-О-метилскутелларин, гептаметоксифлавоон, нобилетин и синенсетин были идентифицированы в неочищенном экстракте мандариновых и апельсиновых корок в течение 25 мин. Как показали результаты определения коэффициентов емкости 17 полиметоксилированных флавонов, проведенные при помощи метода нормально-фазовой ВЭЖХ с использованием четырех систем растворителей с различным содержанием воды, целесообразнее всего осуществлять элюирование смесями *n*-гептан/этанол (75 : 25) и *n*-гептан/изопропанол (60 : 40) при содержании воды от 0,05 до 0,02% [10]. Сложные смеси изофлавоновых агликонов были разделены на μ -порасиле при элюировании различными градиентными системами [11]. Однако быстрое разделение дайдзеина и генистеина, содержащихся в гидролизате *Glycine max*, достигнуто при изократическом элюировании смесью дихлор-



Номер пика	Соединение	R ¹	R ²	R ³	t _R , мин
1	Дельфинидин	ОН	ОН	ОН	5,7
2	Цианидин	ОН	ОН	Н	8,7
3	Петунидин	ОСН ₃	ОН	ОН	11,1
4	Пеларгонидин	Н	ОН	Н	13,6
5	Пеонидин	ОСН ₃	ОН	Н	17,0
6	Мальвидин	ОСН ₃	ОН	ОСН ₃	20,3

Рис. 14.1. Разделение антоцианидинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ [15].

метан/этанол/уксусная кислота (97:3:0,2)/гексан (8:2). Разделение в изократическом режиме сокращает длительность анализа, так как не требует переуравновешивания колонки перед каждым анализом. Для разделения ацетатов флавоноидов также можно использовать силикагель и смеси бензол/ацетонитрил (85:20), бензол/ацетон (90:15) или изооктан/этанол/ацетонитрил (70:16:5,5) [12].

Разделение агликонов с тремя и более свободными гидроксильными группами легко проходит на обращенных фазах с привитыми октадецилсилильными или октилсилильными группами. Практическое применение техники обращенно-фазовой хроматографии описано в работах [13, 14] на примере разделения изофлавоновых агликонов соевых бобов. В работе [15] описано успешное разделение шести наиболее распространенных антоцианидинов на колонке с μ -бондапаком при элюировании смесью вода/уксусная кислота/метанол (71:10:19); в течение 25 мин были получены полностью разрешенные пики шести стандартных антоцианидинов (рис. 14.1).

Приведенные выше условия были использованы для разделения антоцианидинов *Vitis rotundifolia* [15], *Hibiscus sabdariffa* [15], *Vaccinium myrtillus* [16], а также для разделения пигментов цветов при изучении генетических аспектов наследования признаков, связанных с окраской цветов [17].

Разделение α - и β -эпимеров флаван-4-олов — важных промежуточных соединений биосинтеза флавоноидов можно осуществить на колонке с μ -бондапаком C_{18} при элюировании смесью метанол/вода (1:1) или метанол/вода/уксусная кислота (33:65:2) [18]. Условия разделения некоторых типичных флавоноидных агликонов приведены в табл. 14.1.

14.2.2. Флавоноидные гликозиды

Разделение гликозидов проводится, как правило, на обращенных фазах C_{18} при элюировании смесями ацетонитрил/вода или метанол/вода с небольшим содержанием уксусной кислоты. Эти подвижные фазы удобны для разделения сложных смесей гликозидов в условиях градиентного элюирования и допускают использование УФ-детекторов [20—22]. В ряде случаев уксусная кислота заменялась очень небольшим количеством фосфорной кислоты [23—26]. В зависимости от задачи разделения в ряде случаев может оказаться целесообразной замена химически привитой фазы C_{18} на фазу C_8 . Например, флавоно-С-гликозиды изовитексинарабинозид и витексинрамнозид очень плохо разделяются на лихросорбе RP-18, тогда как на фазе RP-8 разделение проходит удовлетворительно (элюент — вода/уксусная кислота/метанол) [27]. Авторы работы [28] выбрали для разделения изомеров О-гликозидов гликофлавонов неподвижную фазу на основе силикагеля с химически привитыми аминогруппами лихросорб NH_2 . Ацилированные флавоно-С-гликозиды семян *Zizyphus jujuba* были разделены на фазе C_{18} , элюентом служила смесь ТГФ/вода (4:53) [29].

Изофлавоновые гликозиды можно разделить на фазах C_{18} при элюировании смесями метанол/вода [30] или ацетонитрил/вода [31]. В работе [23] продемонстрирована возможность эффективного разделения антоцианинов, содержащихся во фруктах и получаемых из них продуктах, на неподвижной фазе μ -бондапак C_{18} . 3- и 3,5-Диглюкозиды антоцианидинов разделяются при элюировании водными растворами уксусной кислоты, а *n*-кумарил-3- и 3,5-дигликозиды — метанольными растворами уксусной кислоты. Для разделения чрезвычайно сложных смесей антоцианинов, содержащих пигменты всех четырех упомянутых выше групп, использовалось программируемое нелинейное градиентное элюирование: от водного раствора уксусной кислоты (стартовый элюент) до водно-метанольных растворов. Следует отметить, что на время удерживания пигментов (в рам-

Таблица 14.1. Типичные условия разделения флавоноидных агликонов и гликозидов при помощи ВЭЖХ

Разделяемые соединения	Неподвижная фаза	Элюент	Литература
Полнметоксилированные флавоновые агликоны	Лихросорб Si 60	n-Гептан/изопропанол (60 : 40), n-гептан/этанол (75 : 25)	9, 10
Флавоновые агликоны	μ-Бондапак C ₁₈	H ₂ O/уксусная кислота/ацетонитрил (68 : 2 : 30)	19
Флавоноидные ацетаты	Лихросорб Si 60	Бензол/ацетонитрил (40 : 60) Бензол/ацетон (90 : 15), изооктан/этанол/ацетонитрил (70 : 16 : 5,5)	12
Изофлавоновые агликоны	μ-Порасил	Дихлорметан/этанол/уксусная кислота (97 : 3 : 0,2)/гексан (12 : 88)	11
	Партисил-10 ODS	H ₂ O/ацетонитрил (4 : 1)	13
Антоцианидины	μ-Бондапак C ₁₈	H ₂ O/уксусная кислота/метанол (71 : 10 : 19)	15—17
		H ₂ O/уксусная кислота/метанол/ацетонитрил (75 : 10 : 7 : 8)	17
Флаво-4-олы	μ-Бондапак C ₁₈	Метанол/H ₂ O (1 : 1) H ₂ O/уксусная кислота/метанол (33 : 65 : 2)	18
Флавоновые и флавоноловые гликозиды	Зорбакс ODS	45→100%-ный метанол, содержащий 0,1% уксусной кислоты	20
	μ-Бондапак C ₁₈	40%-ный метанол в фосфатном б.фере	24
Флаво-С-гликозиды	Лихросорб NH ₂	Ацетонитрил/H ₂ O (1 : 9→9 : 1)	28
Ацетилированные флавоногликозиды	COPELL ODS	ТГФ/H ₂ O (4 : 53)	29
Изофлавоногликозиды	μ-Бондапак C ₁₈	32→90%-ный метанол	30
	Нуклесил ODS	Ацетонитрил/H ₂ O (18 : 32)	31
Антоцианидингликозиды	μ-Бондапак C ₁₈	Уксусная кислота/H ₂ O (15 : 85), метанол/уксусная кислота/H ₂ O (20 : 15 : 65)	23

ках индивидуальных групп) сильное влияние оказывает природа заместителя в В-кольце. Увеличение степени гидроксирования В-кольца приводит к уменьшению времени удерживания. Поскольку антоцианины можно селективно обнаруживать по поглощению вблизи 520 нм, где лишь немногие соединения характеризуются сколько-нибудь заметным поглощением, этим методом можно хроматографировать исходные экстракты растительных материалов, не проводя какую-либо их обработку с целью получения производных пигментов. Авторы работы [32] предложили ВЭЖХ-метод разделения смесей, содержащих гликозилированные антоцианины и 3-дезоксianтоцианины.

Разделение перацетилированных флавоноловых гликозидов рекомендуется проводить на лихросорбе Si 60 путем изократического элюирования смесью бензол/ацетонитрил (4:1) с последующим обнаружением УФ-детектором по поглощению при 300 нм [33]. Некоторые примеры разделения флавоноидных гликозидов различных групп приведены в табл. 14.1.

14.2.3. Ксантоны

В химии природных соединений ксантоны занимают важное место. По своей структуре они родственны флавоноидам, и хроматографическое поведение этих групп соединений также сходно.

Все увеличивающийся интерес к ксантонам обусловлен тем, что они обладают фармакологической активностью (антидепрессанты, ингибиторы моноаминоксидазы), а также играют важную роль в хемотаксометрии [34].

Систематическое изучение возможностей разделения ксантоновых агликонов методом ВЭЖХ проведено Хостеттманом и Мак-Нейром [35]. Слабополярные ксантоны можно легко разделить на неподвижных фазах с химически привитыми CN-группами, элюентом может служить смесь *n*-гексан/хлороформ (13:7) или циклогексан/хлороформ (1:4). Разделение агликонов с двумя и более свободными гидроксильными группами необходимо проводить на менее полярных фазах, например с привитыми NH₂-группами, элюируя их смесями диоксан/дихлорметан (1:9) или изооктан/хлороформ (3:17). Хлороформные экстракты различных видов *Gentiana* были проанализированы при помощи ВЭЖХ, идентификация ксантоновых агликонов была осуществлена с использованием УФ-детектора и масс-спектрометра [36]. Плохо поддающиеся разделению изомерные ксантоновые агликоны гентизин (1,7-дигидрокси-3-метоксиксантон) и изогентизин (1,3-дигидрокси-7-метоксиксантон) удалось разделить на химически привитых фазах C₁₈ элюированием смесью метанол/вода (1:1) [37]. Эти же соединения были разделены на лихросорбе RP-8 при элюировании смесью ацетонитрил/вода [38, 39]. Авторы работы [40] в процессе выделения

нового ксантонового агликаона из *Gentiana corymbifera* прибегли к системе силикагель—хлороформ с небольшим количеством метанола (подвижная фаза).

В работе [37] сделан вывод, что идеальной системой для разделения природных ксантоновых гликозидов является силикагель с химически привитыми группами C_{18} и смесь метанол/вода различного состава. Разделение изомерных дисахаридов было проведено с хорошим разрешением (до нулевой линии) на μ -бондапаке C_{18} при элюировании смесью метанол/вода (45:55). Перметилированные ксантоновые гликозиды можно легко очистить хроматографически на микропаке CN элюированием смесью изоктан/хлороформ (3:7) [36].

14.2.4. Антрахиноны, хиноны и родственные соединения

Несколько примеров разделения хинонов и антрахинонов описаны и обсуждены в обзоре [4]. Поскольку эти полифенолы входят в состав многочисленных лекарственных средств, необходимы быстрые и надежные методы их количественного определения. Один из таких методов, а именно метод разделения и обнаружения арбутина, метиларбутина, гидрохинона и его монометилового эфира разработан авторами работы [41]. Разделение проводится методом обращенно-фазовой хроматографии на μ -бондапаке C_{18} при элюировании смесью метанол/вода (10:90). Разделение всех перечисленных соединений длилось 22 мин, обнаружение осуществлялось при помощи УФ-детектора (280 нм). Арбутин можно легко обнаружить при его содержании менее 25 нг.

Фармакологически чрезвычайно важен препарат алоин, представляющий собой смесь двух стереоизомеров С-гликозидпроизводных антрахинона. В результате хроматографического исследования методом ВЭЖХ сока *Aloe ferox* и *Aloe arborescens* эти два стереоизомера были разделены с хорошим (до нулевой линии) разрешением [42]. Разделение проводили на полупрепаративной колонке с лихросорбтом RP-18 при элюировании смесью метанол/вода (45:55), которое завершилось менее чем за 12 мин. Обнаружение осуществлялось по поглощению при 360 нм (УФ-детектор) [42].

Один из методов качественного и количественного анализ препаратов *Senna* описан в работе [123]. Изомерные диантрон-8,8'-диглюкозиды сеннозид А и сеннозид В были успешно разделены методом ион-парной хроматографии. Наилучшее разрешение было достигнуто на неподвижной фазе. RP-8 при элюировании смесью метанол/ацетонитрил/вода/ИПХ-А-реагент (тетрабутиламмонийфосфат) (15:15:70:1,65). Хроматограмма приведена на рис. 14.2.

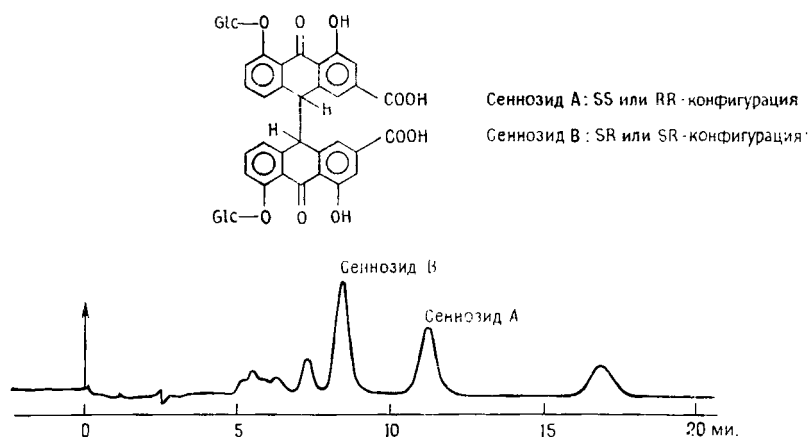


Рис. 14.2. Разделение методом ВЭЖХ препарата *Senna* [123].

Разделение сеннозидов методом ИПХ происходит быстрее, чем при градиентном элюировании [43, 44]. Антрахиноновый агликон реин также входит в состав препаратов на основе *Senna* (экстракты *Cassia angustifolia* или *Cassia senna*). Его также можно выделить методом ИПХ на неподвижной фазе RP-8 при элюировании смесью вода/метанол/ИПХ-А (42:58:1,65) в течение 6 мин [123].

14.2.5. Другие растительные фенольные соединения

Как уже давно известно, лигнанподофиллотоксин и родственные ему соединения обладают антиканцерогенными свойствами. В этой связи авторы работы [45] предложили метод разделения и количественного определения лигнанов в сырых растительных экстрактах при помощи обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Этот метод, как показали эксперименты, позволяет осуществлять скрининг экстрактов с целью определения содержания в них антиканцерогенных агентов. Из числа изученных систем неподвижная фаза — элюент наиболее простой оказалась следующая: лихросорб RP-8 — ацетонитрил/вода (50:50 или 40:60), обеспечивающая удовлетворительное разделение. Для разделения стандартной смеси из восьми лигнанов требуется в этом случае менее 20 мин. Альтернативный метод предусматривает применение силикагеля в качестве неподвижной фазы и смеси хлороформ/гексан (1:1) в качестве элюента. Оба метода были использованы для разделения лигнанов, содержащихся в экстрактах *Austrocedrus chilensis*.

В работе [46] описан простой ВЭЖХ-метод, позволяющий проводить скрининг и точное количественное определение фе-

нольных вторичных лихеновых соединений. Их разделение осуществлялось на колонке с обращенной фазой лихросорб RP-8 при градиентном элюировании: линейный градиент от элюента А (вода/уксусная кислота, 98:2) до элюента Б (метанол) в течение 70 мин. Таким образом была разделена стандартная смесь, состоявшая из тринадцати веществ. Для рутинного анализа сырых экстрактов лихенов рекомендуется использовать хроматографическую систему с предколонкой, что позволяет увеличить время жизни основной колонки.

Повышенный интерес, проявляемый в последнее время к госсиполу, связан с опубликованием статьи, в которой сообщается, что это соединение обладает контрацептическими свойствами [47]. При проведении работ с госсиполом большое значение имеет степень чистоты используемого соединения. Авторами работы [47] разработан чувствительный, селективный и быстрый метод качественного и количественного анализа гидрофобного и ионизируемого полифенолами госсипола. Разделение было осуществлено на обращенной фазе C_{18} . Чтобы получаемый пик был достаточно острым, в подвижную фазу метанол/вода (80:20) добавляли 0,1% фосфорной кислоты. Этот метод пригоден для разделения сырых экстрактов семян хлопчатника.

Обращенная фаза C_{18} была использована также для количественного определения куркумина в ризомерах из *Curcuma longa*; элюентом служила смесь ацетонитрил/вода/уксусная кислота (51:49:5) [48].

Ротенон и его производные получили широкую известность как потенциальные инсектициды. Они высокотоксичны для насекомых и низших живых организмов и относительно мало токсичны для растений и млекопитающих. В работе [49] опубликован один из ВЭЖХ-методов выделения, идентификации и количественного определения ротеноидов в растительных экстрактах. Разделение было проведено на обращенной фазе C_{18} при экспоненциальном градиентном элюировании; стартовый элюент — ацетонитрил/вода (35:65), конечный элюент — 100%-ный ацетонитрил (25 мин).

14.3. Терпеноидные агликоны

Разделение терпеноидных агликонов в зависимости от их полярности можно проводить на силикагеле или на обращенной фазе. В данном разделе мы рассмотрим некоторые типичные примеры их разделения.

Адсорбционная хроматография используется для определения спиростаноловых сапонинов в растениях. Разделение диосгенина, играющего важную роль в производстве стероидов, было осуществлено на колонке с силикагелевой неподвижной фазой (μ -порасил) при элюировании смесью легкий петролей-

ный эфир (т. кип. 60—80 °C)/изопропанол (12:1); детектором служил дифференциальный рефрактометр [50]. Интересный метод изучения тритерпеноидов при помощи ВЭЖХ без их модифицирования предложен авторами работы [51]. Метод основан на сочетании адсорбционной и обращенно-фазовой хроматографии. Шесть аналогов β -амарина можно разделить на силикагелевой фазе зорбакс BP-SIL при элюировании смесью гексан/этанол (96:4), тогда как дигидрокси-, моногидрокси- и монокарбокситритерпеноиды элюируются этой же смесью состава (99:1). Удовлетворительное разделение монокетон- и моногидрокситритерпеноидов достигается при использовании менее полярной подвижной фазы гексан/этанол (99,85:0,15). Более полярные тритерпеноиды, например соясапогенол А и его производные, были разделены на колонке с обращенной фазой зорбакс BP-ODS при элюировании смесью метанол/вода (80:20), содержащей 0,05% муравьиной кислоты концентрации 88%. Хроматографию на обращенной фазе можно использовать и для разделения менее полярных тритерпеноидов (лулеол, ланостерин, фриделин, эупол и др.), применяя в качестве элюента смеси метанол/вода (96:4). Поскольку максимум поглощения тритерпеноидов, имеющих двойную углеродную связь, соответствует 202 нм, эта длина волны была выбрана для обнаружения ненасыщенных соединений данной группы. Она также пригодна для обнаружения и терпеноидов с сопряженными двойными связями.

Валепотриаты были разделены на колонке с силикагелем гексан/этилацетат (20:3) [52]. Адсорбционная хроматография использовалась и для разделения квассиноидов из *Quassia amara* и *Picrasma excelsa*. Элюентом служила смесь дихлорметан/метанол (98:2) [53].

В последнее время для разделения терпеноидов стала более широко применяться обращенно-фазовая хроматография. Некоторые примеры разделения терпеноидов различных типов приведены в табл. 14.2.

14.4. Терпеноидные и стероидные гликозиды

Для разделения терпеноидных гликозидов различных типов применяется обращенно-фазовая хроматография с использованием C_{18} - или C_8 -фаз и смесей метанол/вода или ацетонитрил/вода в качестве элюента.

14.4.1. Иридоидные и секоиридоидные гликозиды

Иридоидные гликозиды содержат всего один или два углеводных остатка и также представляют собой эфиры бензойной, коричной или других подобных кислот. Их можно легко разде-

Таблица 14.2. Применение обращенно-фазовой хроматографии для разделения терпеноидов

Разделяемые терпеноиды	Неподвижная фаза	Элюент	Обнаружение (нм)	Литература
Сесквитерпены эфирных масел	Лихросорб RP-18 Лихросорб RP-8	Ацетонитрил/Н ₂ O (85 : 15) 40→70% ацетонитрила в воде, линейный градиент	УФ (200, 220)	54
Сесквитерпены <i>Solanum</i>	μ-Бондапак C ₁₈	Метанол/Н ₂ O (70 : 30)	УФ (200)	55
Ент-кауреновые дитерпеноиды	Зорбакс ODS	Метанол/Н ₂ O (45 : 55)	УФ (230)	56
Тетранотритерпеноиды	Лихросорб RP-18	Метанол/Н ₂ O (80 : 20)	УФ (217)	57
Слабополярные тритерпеноиды	Зорбакс ODS	Метанол/Н ₂ O	УФ (202)	51
Полярные тритерпеноиды	Зорбакс ODS	Метанол/Н ₂ O (80 : 20), 0,05% муравьиной кислоты (88%-ной)	УФ (200)	51
Гермакронолиды	Не указана	Ацетонитрил/Н ₂ O (1 : 1) Метанол/Н ₂ O (70 : 30)		58 59

лить методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Обнаружение осуществляется УФ-детектором со сменной длиной волны. Один из методов количественного определения гарпагозида, содержащегося в корнях *Harpagophytum procumbens*, описан в работе [60]. Разделение проводится на μ-бондапаке C₁₈ путем элюирования смесью метанол/вода (1:1). Предел обнаружения при 278 нм составляет примерно 0,2 мг/мл, относительное стандартное отклонение 2—5%. В аналогичных условиях было проведено аналитическое и полупрепаративное разделение иридоидных гликозидов *Veronica officinalis* [61], *Scrophularia lateriflora* [62], *Euphrasia salisburgensis* [63] и др. Хотя элюированием водно-метанольными смесями можно разделить до шестнадцати иридоидных гликозидов, получаемые при этом пики иридоидных кислот разрешены неполностью (не достигают нулевой линии). Эти довольно редко встречающиеся соединения можно разделить методом ион-парной хроматографии, используя фосфат тетрабутиламмония в качестве противоиона при pH 7,5 [64].

Секоиридоидные гликозиды, придающие горький вкус корням *Gentiana* и родственным растениям, были разделены [65] на колонке, заполненной фазой C₁₈, при элюировании смесью метанол/вода (1:1). Полное (до нулевой линии) разделение амарогентина, амаропанина и амаросверина потребовало всего

15 мин. Авторы работы [66] также определяли те соединения, которые придают горький вкус различным видам *Gentiana*, проводя разделение на колонке с обращенной фазой при градиентном элюировании смесью метанол/фосфатный буферный раствор. Одновременное определение амарогентина, амаросверина и гентіопикрозидов в *Swertia japonica* было осуществлено на колонке с силикагелем, элюентом служила смесь хлороформ/этанол [67]. Однако количественное определение сврти-амарина — основного компонента лекарственных средств этой группы, выпускаемых в Японии, было проведено на неподвижной фазе C_{18} путем элюирования смесью метанол/вода (10:90) [68]. Соединения обнаруживались по поглощению при 238 нм после 15-мин элюирования с объемной скоростью 1,0 мл/мин. Секоиридоидные гликозиды различных растений рода *Gentianium* были разделены на сферисорбе ODS при элюировании смесью метанол/вода (15:85) [69]. Однако препаративное выделение методом ВЭЖХ сверозида и гентіопикрозида удалось осуществить на силикагеле, элюентом служила смесь этилацетат/метанол (95:5).

14.4.2. Сапонины

В литературе описано всего лишь несколько примеров разделения сапонинов при помощи ВЭЖХ, что отчасти обусловлено проблемами, возникающими при УФ-обнаружении сапонинов, а также сложностью их структуры. Получившие широкую известность выпускаемые в Китае женьшеневые препараты долголетия (корни *Panax ginseng*) изучались в очень многих лабораториях. Один из методов количественного анализа биологически активных даммарановых сапонинов (гинзенозидов) описан в работе [70]. Перед разделением гинзенозиды обрабатывают бензоилхлоридом в пиридине (реакция должна пройти количественно), поскольку получаемые при этом производные гинзенозидов отличаются интенсивным поглощением в УФ-области. Бензоилированные гинзенгиновые сапонины разделяют на колонке с силикагелем при элюировании смесью *n*-гексан/дихлорметан/ацетонитрил (15:3:2) и обнаруживают при 240 нм. Авторами работы [71] предложен один из методов количественного определения гинзенозидов, исключаяющий стадию получения УФ-активных производных. В данном случае колонка заполняется силикагелем, элюентом служит смесь *n*-гептан/*n*-бутанол/ацетонитрил/вода (1000:446:132:36). Обнаружение проводится при 207 нм. Разделение заканчивается через 40 мин. Для определения гинзенозида R_{g1} пригодна обращенно-фазовая система: C_{18} -фаза и смесь метанол/вода (44:56). ВЭЖХ была также применена для выделения гинзенозидов R_f , R_{g2} и R_{h1} из смеси сапонинов [72]. Описанная в этой работе методика вклю-

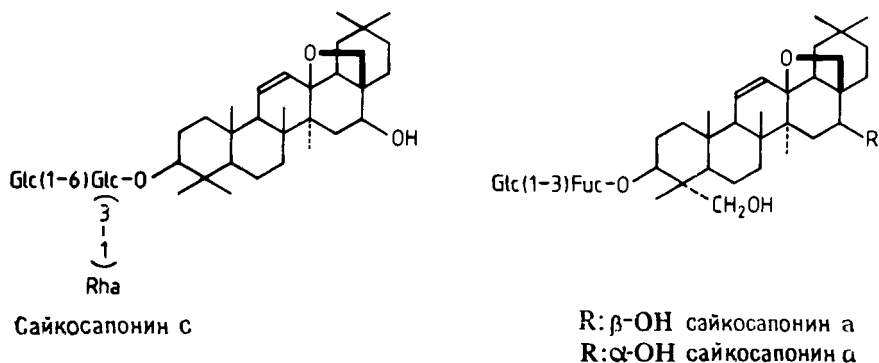


Рис. 14.3. Структура сайкосапонинов.

чает препаративное разделение методом ВЭЖХ на силикагеле путем элюирования верхним слоем смеси *n*-бутанол/этилацетат/вода (4:1:2) и последующее препаративное разделение методом ВЭЖХ на колонке с углеводной неподвижной фазой при элюировании смесью ацетонитрил/вода (86:14). Обнаружение каждого из соединений проводится рефрактометрически. В статье [73] описан еще один пример крупномасштабного выделения гинзенозидов из листьев и стеблей американского женьшеня *Panax quinquefolium* методом, объединяющим колоночную хроматографию на силикагеле и полупрепаративную ВЭЖХ. Разделение методом ВЭЖХ проводится на двух соединенных друг с другом силикагелевых колонках элюированием нижним слоем смеси хлороформ/метанол/этилацетат/вода (2:2:4:1).

Корни *Bupleurum falcatum* (*Bupleuri radix*) служат сырьем для лекарственных средств, играющих очень важную роль в традиционной восточной медицине. В них содержатся три основных сапонины олеанового типа — так называемые сайкосапонины а, с и d (рис. 14.3). Авторы работы [74] провели изучение *Bupleuri radix* методом ВЭЖХ. Истинные сайкосапонины, содержащие лабильные аллилоксидные связи, были превращены в УФ-активные диеновые сапонины мягкой кислотной обработкой и далее разделены при помощи обращенно-фазовой хроматографии на колонке с октадецилсилилированным силикагелем при элюировании смесью метанол/вода/уксусная кислота/триэтиламин (75:25:0,2:0,2).

Первым в этих условиях элюировался диеновый сапонин, полученный из сайкосапонина с, далее следовали менее полярные диеновые производные — сайкосапонины d и а. Разделение с хорошим разрешением (пики достигали нулевой линии) длилось всего 20 мин, хотя производные последних двух сапонинов различались лишь конфигурацией при C-16-ОН. Обнаружение про-

водилось при 254 нм, в качестве внутреннего стандарта для количественного анализа можно использовать антрацен.

Авторами работы [75] предложена методика количественного определения глицирризиновой кислоты из *Radix liquiritiae* (*Glycyrrhiza glabra*), предусматривающая разделение на обращенной фазе μ -бондапак C_{18} элюированием смесью метанол/вода/уксусная кислота (60:34:6). В этих же целях можно использовать также ИОХ [76].

14.4.3. Сердечные гликозиды

Эти гликозиды найдены в нескольких семействах растений. Они используются для лечения болезней, вызванных ослаблением сердечной деятельности. Некоторыми из этих соединений когда-то отравляли стрелы. Сердечные гликозиды содержат два типа агликонов — с пяти- или шестичленным лактоновым циклом. Гликозиды с агликонами первого типа называют карденолидами (например, дигитоксигенин), а гликозиды с агликонами второго типа получили название буфанолиды или буфадиенолиды (сцилларенин). Ввиду важности лекарственных препаратов на основе сердечных гликозидов и их фармацевтических репертур проблеме разделения этих гликозидов при помощи ВЭЖХ посвящено очень большое число работ, особенно если учесть, что первая публикация на эту тему появилась в 1974 г. [1]. Предложенные методики разделения предусматривают использование ИОХ, адсорбционной и обращенно-фазовой хроматографии. В некоторых случаях перед разделением исходные гликозиды переводят в их производные [77, 78]. Сердечные гликозиды, содержащиеся в растениях рода *Digitalis*, можно разделить на силикагеле или на обращенной фазе. Прекрасное сравнительное изучение этих двух подходов, проведенное авторами работы [79], показало, что адсорбционная и обращенно-фазовая хроматография дополняют друг друга. Поскольку элюирование в этих двух системах действительно происходит в обратном порядке, каждый может, как правило, выбрать такую систему, которая больше отвечает требованиям (например, по времени разделения или разрешению). Если разделение ведется на силикагеле, в качестве элюента рекомендуется пользоваться смесью дихлорметан/метанол/вода (920:80:12), тогда как идеальными элюентами для разделения на колонках с химически привитой обращенной фазой C_{18} являются смеси ацетонитрил/вода (37:63) и диоксан/вода (45:55). Обнаружение осуществляется УФ-детектором (230 нм). Обращенно-фазовые системы несколько более предпочтительны с точки зрения подготовки для анализа проб готовых форм.

Буфадиенолидные гликозиды, содержащиеся в растениях рода *Urginea maritima*, различных родов *Scilla* и в препаратах

Таблица 14.3. Разделение сердечных гликозидов

Разделяемые глико- зиды	Неподвижная фаза	Элюент	Обна- руже- ние, нм	Лите- ратура
Гликозиды дигитали- са (низкой поляр- ности)	Лихросорб Si-60	<i>n</i> -Пентанол/ацето- нитрил/изооктан/ H ₂ O (175 : 60 : 620 : : 10)	220	82
Гликозиды дигитали- са (средней и вы- сокой полярности)	Лихросорб Si-60	<i>трет</i> -Бутанол/ацето- нитрил/гептан/H ₂ O (204 : 93 : 712 : 10,4)	220	82
Ланатозид С и со- путствующие веще- ства	Лихросорб Si-100	Дихлорметан/мста- нол/H ₂ O (320 : 80 : : 12)	230	79
Гликозиды дигитали- са	Нуклеосил C ₁₈	Ацетонитрил/H ₂ O (37 : 63), диоксан/ H ₂ O (45 : 55), ТГФ/диоксан (2 : 1)/H ₂ O (67 : 33)	230	
Буфадиенолидные гликозиды (глико- зиды Scilla)	Нуклеосил C ₁₈ или μ -бондапак C ₁₈	Ацетонитрил/H ₂ O (1 : 3)	280	81
	Лихросорб RP-8	Ацетонитрил/H ₂ O (18 : 28)		80

Scilla, были проанализированы качественно и количественно методом обращенно-фазовой ВЭЖХ при элюировании смесями ацетонитрил/вода [80, 81]. Наличие системы сопряженных двойных связей в этих гликозидах облегчает их обнаружение по поглощению в УФ-области при 280 или 300 нм.

Некоторые типичные примеры разделения при помощи ВЭЖХ сердечных гликозидов приведены в табл. 14.3.

Для анализа бутадиенолидов и карденолидов особенно эффективна обращенно-фазовая хроматография на μ -бондапаке при элюировании смесями метанол/вода (2 : 1), ацетонитрил/вода (1 : 1) или ТГФ/вода (2 : 3) [83].

14.4.4. Различные гликозиды

Посредством полупрепаративной ВЭЖХ был выделен новый вид монотерпеновых глюкозидов из выпускаемого в Китае лечебного препарата, изготовляемого из *Schizonepeta tenuifolia* [84]. Неподвижной фазой служил μ -бондапак C₁₈, элюентом — смесь ацетонитрил/метанол/вода (1 : 1 : 4), обнаружение осуществлялось автоматически. Эти глюкозиды, по-видимому, имеют следующее строение:

(1S,4R,8E)-9-O- β -D-глюкопиранозил-*n*-мент-8(9)-ен-3-он. К ним относится также глюкозид (1S,4R,8R)-8,9-дигидрокси-*n*-мент-3-он, последний глюкозид имеет диоксановое кольцо, образованное двойными связями между глюкозой и агликоном.

14.5. Алкалоиды

Обсуждению методов разделения алкалоидов при помощи ВЭЖХ посвящен ряд обзоров [1, 3, 85, 86], а число соответствующих статей постоянно растет. Алкалоиды входят в состав многих семейств растений и относятся к числу важных природных продуктов в связи с их биологической и фармакологической активностью.

В настоящее время ВЭЖХ широко используется для определения алкалоидов, например в токсикологических и фотохимических исследованиях, анализе метаболитов [86].

Алкалоиды — это соединения с основными свойствами, поэтому при их разделении рН элюента должен быть выше 7, так как при этом подавляется ионизация и пики сужаются. Вместе с тем при высоких значениях рН наблюдается растворение силикагеля. В большинстве случаев предпочтительно использовать химически привитые фазы, но и их стабильность не бесконечна. Некоторые алкалоиды можно разделять на C_{18} -привитых фазах при кислотном рН элюента (фосфатный буфер, рН 2,7) [87]. Альтернативные методы основаны на использовании ион-парной [87] и ионообменной [88] хроматографии. В недавних публикациях отмечено, что для разделения определенных классов алкалоидов следует выбирать кислые элюенты и неподвижные фазы C_{18} . Недавно появившиеся неподвижные фазы на основе стирол-дивинилбензолных смол позволяют применять элюенты с высоким рН, что дает возможность добиваться получения симметричных пиков без добавления в элюент ион-парных реагентов [89].

Поскольку класс алкалоидов весьма обширен и разнообразен и поскольку число публикаций, посвященных их разделению при помощи ВЭЖХ, чрезвычайно велико, мы ограничимся обсуждением лишь тех статей, которые появились в печати в последнее время.

14.5.1. Пуриновые алкалоиды

Анализ алкалоидов, входящих в состав водных экстрактов чая, был успешно проведен с использованием μ -бондапака C_{18} и смеси метанол/0,1 М цитратно-фосфатный буфер (рН 7,0) (20:80) в качестве элюента [90]. Теобромин, теofilлин и кофеин были разделены менее чем за 10 мин. Один из общих методов определения кофеина в овощах и сырье для фармацевтической промышленности основан на применении C_{18} -фазы и смеси метанол/вода (60:40) [91]. Обнаружение осуществляется при 280 нм, внутренним стандартом служит 8-хлортеofilлин. Метод позволяет проводить одновременное определение теобромина, теofilлина и кофеина.

Теофиллин (1,3-диметилксантин) — это лекарственное средство, предназначенное для лечения астмы, терапевтическая активность которого зависит от его концентрации в крови. Поэтому необходим метод, позволяющий проводить быстрый количественный анализ теофиллина. Многие из таких методов основаны на применении ВЭЖХ. Один из них предусматривает использование C_{18} -фазы партисил-100DS-2 и элюирование смесью метанол/0,025 М KH_2PO_4 (65:35) [92], причем для анализа достаточно 10 мкл сыворотки крови, которую вводят непосредственно на предколону. Обнаружение осуществляют УФ-детектором (254 нм), другие содержащиеся в пробе ксантины на результаты анализа влияния не оказывают.

14.5.2. Морфиновые алкалоиды

Хотя первая публикация, посвященная разделению морфиновых алкалоидов, появилась только в 1973 г., в настоящее время число работ, в которых рассматривается эта проблема, весьма велико. Разделение этих алкалоидов, как правило, проводят на колонках с обращенной фазой C_{18} . При разделении морфина, кодеина и тебаина элюентами служат смеси метанол/0,1 М KH_2PO_4 (7:43) [94], метанол/0,3%-ный карбонат аммония (4:1) [95], ацетонитрил/0,1 М NaH_2PO_4 (1:3 или 1:19 при рН 4,8) [96]. Авторы работы [97] провели одновременное разделение шести основных алкалоидов, входящих в состав опиума, на обращенной фазе C_{18} в изократическом режиме без добавления ион-парных реагентов [97]. Элюентом служила смесь 1%-ный аммонийацетатный буфер плюс уксусная кислота до рН 5,8 и ацетонитрил или смесь этого буфера, ацетонитрила и диоксана. Обнаружение осуществлялось при 254 нм. Этот простой и надежный метод пригоден для рутинного количественного анализа сырого опиума. Разделение с прекрасными результатами морфина и наркотелина на C_{18} -фазе при элюировании смесью метанол/диоксан/0,01 М CH_3COONa заняло всего 5 мин (морфин элюировался перед наркотелином) [98]. Однако если в состав элюента не входил водный буфер, то порядок элюирования менялся на обратный. Такой элюент пригоден и для разделения минорных опийных алкалоидов — палаудина, папаверина и изокорипальмина.

Автор работы [88] исследовал влияние на время удерживания на колонке с силикагелем ряда опийных алкалоидов изменения полярности элюента, переходя от нормально-фазовой системы, содержащей 1% воды, к ионообменной, содержащей 90% воды. Эффективность использованной им силикагелевой колонки при элюировании смесью ацетонитрил/вода/ледяная уксусная кислота/диэтиламин (10:90:0,5:0,5) достигала 6000 теоретических тарелок по тебину ($k=2,0$).

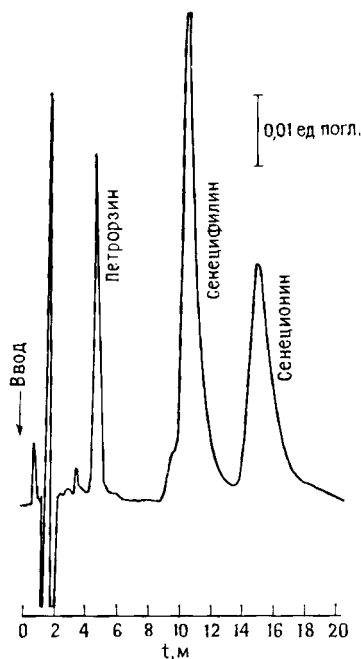


Рис. 14.4. Разделение экстрактов *Senecio vulgaris* [89].

Элюент: ацетонитрил/0,1 М водный раствор аммиака (25 : 75), 1 мл/мин.

14.5.3. Пирролизидиновые алкалоиды

В последнее время пирролизидиновым алкалоидам уделяется большое внимание из-за их токсичности. Они входят в состав самых различных семейств растений и вызывают интерес в свете возможного их применения как в медицине, так и в ветеринарии. Разделению методом ВЭЖХ пирролизидиновых алкалоидов, содержащихся в различных растениях рода *Senecio*, посвящена серия очень интересных статей [99—103]. Один из предложенных методов предусматривает разделение на μ -бондапаке CN и элюирование смесью ТГФ/0,01 М аммоний-карбонатный буфер (pH 7,8) (16 : 84) [99]. Петрорсин, сенецифиллин и сенеционин из *Senecio vulgaris* были разделены на C_{18} -фазе при элюировании в изократическом режиме смесью метанол/0,01 М калий-фосфатный буфер (pH 6,3) (1 : 1) [103]. Этот элюент, по-видимому, наиболее пригоден для разделения пирролизидиновых алкалоидов со сходными свойствами. Авторы работы [89] использовали обращенно-фазовую хроматографию с неподвижной фазой на основе стиролдивинилбензола для разделения алкалоидов из *Senecio jacobaea* и *Senecio vulgaris*. В последнем случае основные компоненты разделялись в течение 18 мин, элюентом служила смесь ацетонитрил/0,1 М водный раствор аммиака (25 : 75) (рис. 14.4).

В сочетании со стирол-дивинилбензолными неподвижными фазами допускается использование подвижных фаз с более высоким рН, разрушающих силикагелевые неподвижные фазы. Соединения основного характера дают при разделении в таких условиях вполне симметричные пики в отсутствие ион-парных реагентов. Для препаративных работ рекомендуются элюенты на основе ацетонитрила и водных растворов аммиака, поскольку они допускают упаривание в вакууме, тогда как если элюентами служат фосфатные буферные растворы, необходимо прибегать к экстракции. Ацетонитрил, предназначенный для ВЭЖХ, слабо поглощает при 220 нм, поэтому разделение пирролизидиновых алкалоидов градиентным элюированием не сопровождается снижением чувствительности и дрейфом нулевой линии. И наконец, снимаются проблемы, связанные с необходимостью использования твердых буферных солей, тогда как при разделении алкалоидов других классов такие проблемы приходится решать.

Для анализа пирролизидин-N-оксидных алкалоидов, содержащихся в растениях рода *Symphytum*, авторы работы [104] применили колонку, заполненную μ -бондапаком NH_2 , элюентом служила смесь ацетонитрил/вода (92 : 8).

14.5.4. Индольные алкалоиды

Методы выделения и разделения индольных алкалоидов рассмотрены в работе [86], автор которой изучил влияние основного модификатора на разделение стрихнина и бруцина. Очень быстрое разделение с хорошим разрешением этих алкалоидов было осуществлено на колонке с силикагелем при элюировании смесью эфир/метанол (9 : 1), содержащей 1% диэтиламина. Образование хвостов при этом не происходило. Алкалоиды, продуцируемые культурой клеток *Catharanthus roseus*, были разделены методом обращенно-фазовой хроматографии, элюентом служила смесь ацетонитрил/вода (62 : 38), содержащая 0,1% триэтиламина [105]. Для количественного определения винкамина, аповинкамина и 14-эпивинкамина предложена [106] следующая хроматографическая система: неподвижная фаза на основе привитого октадецилсилана, а в качестве элюента — смесь метанол/0,01 М карбонат аммония (75 : 25), рН 7,8. Роль внутреннего стандарта выполнял папаверин. Обнаружение осуществлялось при 254 нм. Чувствительность и точность данного метода достаточно высоки, и он пригоден для рутинного определения винкамина в лекарственных препаратах, разбавленной моче и плазме крови. Винкамин и близкие ему по структуре алкалоиды можно также разделить на лихросорбе RP-8 или μ -бондапаке C_{18} при элюировании смесью ацетонитрил/0,01 М карбонат аммония (6 : 4 или 7 : 3) [107]. Данный метод приго-

ден для разделения стереоизомеров, сложных эфиров-гомологов и для группового разделения. Однако оптические или структурные изомеры в этом случае не разделяются. Их хроматографирование рекомендуется проводить на колонке с силикагелем при элюировании смесями хлороформ/метанол (95:5), *n*-гексан/хлороформ/метанол (60:30:10 или 80:10:10) [108]. Элюирование четырехкомпонентной смесью *n*-гексан/хлороформ/ацетонитрил/метанол (55:25:20:3) еще больше повышает селективность разделения и позволяет разделять *цис*- и *транс*-изомеры, например *транс*-изомеры этиловых эфиров аповинкамовой, эливинкамовой и винкамовой кислот элюируются перед соответствующими *цис*-изомерами.

14.5.5. Другие алкалоиды

Разделение основных представителей группы хинных алкалоидов осуществлено на химически привитой фазе C_{18} путем элюирования смесью метанол/уксусная кислота/вода (25:1:75) [109], однако для разделения цинхонина и цинхонидина необходимо несколько другое соотношение компонентов (20:1:80). Данный метод селективен, достаточно достоверен и пригоден для анализа лекарственных препаратов или препаратов, содержащих соли хинина.

Различные аконитиновые алкалоиды можно разделить на неподвижной фазе C_{18} при элюировании смесью ТГФ/фосфатный буфер (pH 2,7) (89:11) [87]. Альтернативный метод — ион-парная хроматография (элюент — ТГФ/фосфатный буфер, pH 2,7, 85:15, в присутствии 0,01 М гексансульфоната натрия в качестве противоиона). Предел обнаружения мезаконитина составляет 12 нг, бензоилмезаконитина 15 нг. Чувствительность обнаружения при 235 нм в пять раз выше, чем при 254 нм.

Для анализа алкалоидов спорыньи обычно используют фазу C_{18} и смесь ацетонитрил/0,01 М карбонат аммония (1:2 или 2:3) в качестве элюента [1]. Однако разделение новых природных лактамовых производных алкалоидов группы эрготоксина осуществлено на лихросорбе NH_2 при элюировании смесью эфир/этанол (96:4). Смесью пар диастериомеров эргокристина и эргокристама разделялась в этих условиях в течение 12 мин [110].

Колхицин, основной алкалоид растений рода *Colchicum*, обладает интересными фармакологическими свойствами; он был исследован несколькими группами ученых. Разделение этих алкалоидов при помощи ВЭЖХ было впервые осуществлено на колонке с силанизированным силикагелем элюированием смесью ацетонитрила с водой [111]. Позднее было проведено успешное разделение смеси из шести производных колхицина на фазе C_{18} при элюировании смесью ацетонитрил/метанол/фосфатный бу-

фер (рН 6,0) (16:7:79) [112]. Эти же условия были использованы для одновременного определения колхицина и колхицеина в культуре микробов, а также для определения содержания колхицеинамида в процессе трансформации микроорганизмов N-метилколхицеинамидом [114].

14.6. Неалкалоидные азотсодержащие вещества

Беталаины — это растительные пигменты, возрастающий интерес к которым обусловлен их хемотаксономической ролью, а также использованием в качестве пищевых красителей. ВЭЖХ-метод быстрого анализа бетаксантинов предусматривает применение лихросорба RP-8 в качестве неподвижной фазы и градиентное элюирование смесью метанол/уксусная кислота/вода [115]. В работе [116] описан усовершенствованный вариант методики разделения методом обращенно-фазовой хроматографии. Смесь семи бетаксантинов и семи бетанининов была разделена на колонке с лихросорбом RP-18 в следующих условиях: линейный градиент (60 мин) от растворителя А (1,5%-ный раствор фосфорной кислоты в воде) до смеси А+40% Б (фосфорная кислота/уксусная кислота/ацетонитрил/вода, 1,5:20:25:53,5). Этим методом осуществлен качественный анализ пигментов в неочищенных растительных экстрактах. Хорошее разделение бетанина и его изомера изобетанина получено на μ -бондапаке C_{18} при элюировании смесью метанол/0,05 М KH_2PO_4 (18:82) плюс фосфорная кислота до рН 2,75 или при градиентном элюировании, предусматривающем увеличение содержания метанола в элюенте.

Для определения капсаицина, придающего остроту стручковому красному перцу, в экстрактах *Fructus capsici* авторы работ [118—120] применили обращенно-фазовую ВЭЖХ (элюентом в этом случае служила смесь метанол/вода). Предел обнаружения капсаицина составил около 100 нг. Более чувствительный метод предложен авторами работы [121]. Разделение смеси капсаицина и шести его аналогов проводят на фазе C_{18} , элюентом служит смесь ацетонитрил/вода (40:60). Обнаружение осуществляется по флуоресценции (длина волны возбуждения 270 нм, испускания 330 нм), в результате чего предел обнаружения капсаицина снижается до 3 нг.

14.7. Выводы и перспективы

Анализ опубликованных данных позволяет заключить, что для разделения природных продуктов наиболее широко используется обращенно-фазовая хроматография. Введение ион-парных ре-

агентов делает метод пригодным для анализа содержащихся в растениях соединений самой различной полярности. Весьма перспективными представляются неподвижные фазы на основе полистирол-дивинилбензольных смол, на которых уже было успешно проведено разделение пирролизидиновых алкалоидов [89].

Как важный этап дальнейшего развития ВЭЖХ следует рассматривать объединение ВЭЖХ с масс-спектрометрией. В работе [122] опубликованы очень интересные результаты, полученные при использовании хромато-масс-спектрометрии в потоке. Часть поступающего из колонки элюата при помощи соответствующего делителя потока направляется в хемононизационную камеру квадрупольного спектрометра, где фракции элюата подвергаются ионизации, причем подвижная фаза способствует мягкой ионизации анализируемых компонентов. Этот метод применен для изучения гликозидов *Digitalis*. В данном случае дигитоксин можно обнаруживать в виде его молекулярного иона.

Масс-спектрометрия как метод обнаружения в ВЭЖХ удобна при исследовании полярных или термически нестойких компонентов растений. Хромато-масс-спектрометрия дает важную информацию о структуре разделяемых соединений непосредственно в ходе анализа, поэтому этот метод найдет широкое применение в исследованиях природных продуктов.

Литература

1. Kingston D. G. I. J. Nat. Prod., 42, 237 (1979).
2. Adams M. A., Nakanishi K. J. Liquid Chromatogr., 2, 1097 (1979).
3. Wehrli A., Hidenbrand J. C., Keller H. P., Stampfl R., Frei R. W., J. Chromatogr., 149, 199 (1978).
4. Van Sumere C. F., van Brussel W., van de Castele K., van Rompaey L., in: Swain T., Harbone J. B., van Sumere C. F. (Eds.): Biochemistry of Plant Phenolics, Recent Advances in Phytochemistry, v. 12, p. 1—28, Plenum Press, New York, 1979.
5. Hostettmann K., Hostettmann M., in: Harborne J. B., Marby T. J. (Eds.): Advances in Flavonoid Research, 1975—1981, pp. 1—18, Chapman and Hall, London, 1982.
6. Görlner K., Mutter S., Westphal C. Planta med., 37, 1 (1979).
7. Dewaele C., Verzele M. J. Chromatogr., 197, 189 (1980).
8. Schwarzenbach R. J. Liquid. Chromatogr., 2, 205 (1979).
9. Bianchini J. P., Gaydou E. M. J. Chromatogr., 190, 233 (1980).
10. Bianchini J. P., Gaydou E. M. J. Chromatogr., 211, 61 (1981).
11. Carlson R. E., Dolphin D. J. Chromatogr., 198, 193 (1980).
12. Galsensa R., Herrmann K. J. Chromatogr., 189, 217 (1980).
13. West L. G., Birac P. M., Pratt D. E. J. Chromatogr., 150, 266 (1978).
14. Murphy P. A. J. Chromatogr., 211, 166 (1981).
15. Wilkinson M., Sweeny J. G., Lacobucci G. A. J. Chromatogr., 132, 349 (1977).
16. Brenneisen R., Steinegger E. Pharm. Acta Helv., 56, 180 (1981).
17. Akavia N., Strack D. Z. Naturforsch., 35c, 16 (1980).
18. Udupa S. R., Patankar A. V. J. Chromatogr., 205, 470 (1981).

19. Charpentier B. A., Cowles J. R. J. *Chromatogr.*, **208**, 132 (1981).
20. Niemann G. J., Koerselmann-Kooy J. W. *Planta med.*, **31**, 397 (1977).
21. Strack D., Krause J. J. *Chromatogr.*, **156**, 359 (1978).
22. Quercia V., Turchetto L., Pierini N., Cuozzo V., Percaccio G. J. *Chromatogr.*, **161**, 396 (1978).
23. Williams M., Hrazdina G., Wilkinson M., Sweeny J. G., Lacobucci G. A. J. *Chromatogr.*, **155**, 389 (1978).
24. Court W. A. J. *Chromatogr.*, **130**, 287 (1977).
25. Seitz C. T., Wingard R. E. J. *Agric. Food Chem.*, **26**, 278 (1978).
26. Niemann G. J., van Brederode J. J. *Chromatogr.*, **152**, 523 (1978).
27. Strack D., Fuisting K., Popovici G. J. *Chromatogr.*, **176**, 270 (1979).
28. Becker H., Wilking G., Hostettmann K. J. *Chromatogr.*, **136**, 174 (1977).
29. Woo W. S., Kang S. K., Wagner H., Seligmann O., Chari V. M. *Phytochemistry*, **19**, 2791 (1980).
30. Ohta N., Kuwata G., Akahori H., Watanabe T. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 469 (1980).
31. Akada Y., Kawano S., Yamagishi M. *Yakugaku Sasshi*, **100**, 1057 (1980).
32. Strack D., Akavia N., Reznik H. Z. *Naturforsch.*, **35c**, 533 (1980).
33. Henning W., Herrmann K. *Phytochemistry*, **19**, 2727 (1980).
34. Hostettmann K., Wagner H. *Phytochemistry*, **16**, 821 (1977).
35. Hostettmann K., McNair H. M. J. *Chromatogr.*, **116**, 201 (1976).
36. Hostettmann K., Jacott-Guillarmod A. J. *Chromatogr.*, **124**, 381 (1976).
37. Petit M. J., Hostettmann K. J. *Chromatogr.*, **154**, 106 (1978).
38. Hupe K.-P., Lauer H. H., Zech K. *Chromatographia*, **13**, 413 (1980).
39. Schuster R. *Chromatographia*, **13**, 379 (1980).
40. Massias M., Carbonnier J., Mohlo D. *Phytochemistry*, **20**, 1577 (1981).
41. Sticher O., Soldati F., Lehmann D. *Planta med.*, **35**, 253 (1979).
42. Grün M., Franz G. *Pharmazie*, **34**, 669 (1979).
43. Christ B., Pöppinghaus T., Wirtz-Peitz F., *Arzneim-Forsch./Drug Des.*, **28**, 255 (1978).
44. Erni F., Frei R. J. *Chromatogr.*, **125**, 265 (1976).
45. Cairnes D. A., Kingston D. G. I., Rao M. M. J. *Nat. Prod.*, **44**, 34 (1981).
46. Strack D., Feige G. B., Kroll R. Z. *Naturforsch.*, **34c**, 695 (1979).
47. Abou-Donia S. A., Lasker J. M., Abou-Donia M. B. J. *Chromatogr.*, **206**, 606 (1981).
48. Asakawa N., Tsuno M., Hattori T., Ueyama M., Shinoda A., Miyake Y., Kagei K. *Yakugaku Zasshi*, **101**, 374 (1981).
49. Moring S. E., McChesney J. D., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 774 (1979).
50. Mahato S. B., Sahu N. P., Roy S. K., *J. Chromatogr.*, **206**, 169 (1981).
51. Lin J.-T., Nes W. D., Heftmann E. J. *Chromatogr.*, **207**, 457 (1981).
52. Tittel G. Ph. D. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1978.
53. Nestler T., Tittel G., Wagner H. *Planta med.*, **38**, 204 (1980).
54. Strack D., Proksch P., Gültz P.-G. Z. *Naturforsch.*, **35c**, 675 (1980).
55. Heisler E. G., Siciliano J., Kalan E. B., Osman S. F. J. *Chromatogr.*, **210**, 365 (1981).
56. Ganjan I., Kubo I., Kubota T. J. *Chromatogr.*, **200**, 250 (1980).
57. Kraus W., Cramer R. *Liebigs. Ann. Chem.*, **1**, 1981 (1981).
58. Bohlmann F., Ziesche J., King R. M., Robinson H. *Phytochemistry*, **20**, 263 (1981).
59. Bohlmann F., Jakupovic J., Robinson H., King R. M. *Phytochemistry*, **20**, 109 (1981).
60. Sticher O., Meier B. *Disch. Apoth. Ztg.*, **117**, 1431 (1977).
61. Afifi-Yazar F. O., Sticher O. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 1905 (1980).
62. Sticher O., Meier B., Lehmann D., Swiatek, *Planta med.*, **38**, 246 (1980).
63. Sticher O., Salama O. *Helv. Chim. Acta*, **64**, 78 (1981).
64. Meier B., Sticher O. J. *Chromatogr.*, **138**, 453 (1977).
65. Sticher O., Meier B. *Pharm. Acta. Helv.*, **53**, 40 (1978).

66. Quercia V., Battaglini G., Pierini N., Turchetto L. J. *Chromatogr.*, **193**, 163 (1980).
67. Takino Y., Koshioka M., Miyahara T., Tanizawa H., Ishi Y., Kawaguchi M., Higashino M., Hayashi T. *Planta med.*, **38**, 344 (1980).
68. Koshioka M., Takino Y., Hayashi T. *Planta med.*, Supplement 64 (1980).
69. Van der Sluis W. G., Labadie R. P. *Planta med.*, **41**, 221 (1981).
70. Besso H., Saruwatari Y., Futamura K., Kunihiro K., Fuwa T., Tanaka O. *Planta Med.*, **37**, 226 (1979).
71. Sticher O., Soldati F. *Planta med.*, **36**, 30 (1979).
72. Nagasawa T., Choi J. H., Nishino Y., Oura H. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3701 (1980).
73. Chen S. E., Staba E. J. *Lloydia*, **41**, 361 (1978).
74. Kimata H., Hiyama C., Yahara S., Tanaka O., Ishikawa O., Aiura M. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1836 (1979).
75. Sticher O., Soldati F. *Pharm. Acta Helv.*, **53**, 46 (1978).
76. Akada Y., Tanase Y. *Yakugaku Zasshi*, **96**, 1035 (1976).
77. Nachtmann F. Z. *Anal. Chem.*, **282**, 209 (1976).
78. Gjeller J., Frey G., Frei R. W. *J. Chromatogr.*, **142**, 271 (1977).
79. Erni F., Frei R. W. *J. Chromatogr.*, **130**, 169 (1977).
80. Jurenitsch J., Kopp B., Kirchner H., Kubelka, *Planta med.*, **39**, 272 (1980).
81. Tittel G., Wagner H. *Planta med.*, **39**, 125 (1980).
82. Lindner W., Frei R. W. *J. Chromatogr.*, **117**, 81 (1976).
83. Shimada K., Hasegawa M., Hasebe K., Fujii Y., Nambara T. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2995 (1976).
84. Sasaki H., Taguchi H., Endo T., Yosioka I., Iitaka Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1636 (1981).
85. Verpoorte R., Svendsen A. B. *J. Chromatogr.*, **100**, 227 (1974).
86. Verpoorte in: J. D. Phillipson, M. H. Zenk (Eds.): *Indole and Biogenetically Related Alkaloids*. Phytochemical Society of Europe Symposium Series, No. 17, pp. 91—112. Academic Press, London 1980.
87. Hikino H., Konno C., Watanabe H., Ishikawa O. *J. Chromatogr.*, **211**, 123 (1981).
88. Hansen S. H. *J. Chromatogr.*, **212**, 229 (1981).
89. Ramsdell H. S., Buhler D. R. *J. Chromatogr.*, **210**, 154 (1981).
90. Hoefler A. C., Coggon P. *J. Chromatogr.*, **129**, 460 (1976).
91. Baltassat-Millet F., Ferry S., Dorche J. *Ann. Pharm. Fr.*, **38**, 127 (1980).
92. Popovich D. J., Butts E. T., Lancaster C. J. *J. Liquid Chromatogr.*, **1**, 469 (1978).
93. Wu C. Y., Siggia S., Robinson T., Waskiewicz R. D. *Anal. Chim. Acta*, **63**, 393 (1973).
94. Gupta W. D. *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1697 (1976).
95. Wu F. F., Dobberstein R. H. *J. Chromatogr.*, **140**, 65 (1977).
96. Wu C. Y., Wittick J. J., *Anal. Chem.*, **49**, 359 (1977).
97. Nobuhara Y., Hirano S., Namba K., Hashimoto M. *J. Chromatogr.*, **190**, 251 (1980).
98. Proksa B., Cerny J. *Pharmazie*, **36** (1981).
99. Qualls C. W., Segall H. J. *J. Chromatogr.*, **150**, 202 (1978).
100. Segall H. J., *Toxicol. Lett.*, **1**, 279 (1978).
101. Segall H. J., Molyneux R. J. *Chem. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 545 (1978).
102. Segall H. J., Krick T. P. *Toxicol. Lett.*, **4**, 193 (1979).
103. Segall H. J., *J. Liquid Chromatogr.*, **2**, 429 (1979).
104. Wagner H., Neidhardt V., Tittel G. *Planta med.*, **41**, 232 (1981).
105. Kurz W. G. W., Chatson K. B., Constabel F., Kutney J. P., Choi L. S. L., Kolodziejczyk P., Sleigh S. K., Stuart K. L., Worth B. R. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 1891 (1980).
106. Pietta P., Rava A., Catenacci E. *J. Chromatogr.*, **210**, 149 (1981).
107. Szepesi G., Gazdag M. *J. Chromatogr.*, **204**, 341 (1981).
108. Szepesi G., Gazdag M. *J. Chromatogr.*, **205**, 57 (1981).

109. Johnston M. A., Smith W. J., Kennedy J. M., Lea A. R., Hailey D. M. *J. Chromatogr.*, **189**, 241 (1980).
110. Flieger M., Wurst M., Stuchlik J., Rehacek Z. *J. Chromatogr.*, **207**, 139 (1981).
111. Forni G., Massarani G. *J. Chromatogr.*, **131**, 444 (1977).
112. Davis P. J., Klein A. E. *J. Chromatogr.*, **188**, 280 (1980).
113. Klein A. E., Davis P. J. *Anal. Chem.*, **52**, 2431 (1980).
114. Davis P. J. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 465 (1981).
115. Strack D., Reznik H. Z. *Pflanzenphysiol.*, **94**, 163 (1979).
116. Strack D., Engel V., Reznik H. Z. *Pflanzenphysiol.*, **101**, 215 (1981).
117. Schwartz S. J., von Elbe J. H., *Agric. Food Chem.*, **28**, 540 (1980).
118. Sticher O., Soldati F., Joshi R. K. *J. Chromatogr.*, **166**, 221, (1978).
119. Jurenitsch J., David M., Heresch F., Kubelka W. *Planta med.*, **36**, 54, (1979).
120. Jurenitsch J., David M., Heresch F., Kubelka W. *Planta med.*, **36**, 61 (1979).
121. Saria A., Lembeck F., Skofitsch G. *J. Chromatogr.*, **208**, 41 (1981).
122. Dixon D. J. The Application of the Direct Liquid LC-MS Interface to Problems in Biochemistry. Hewlett-Packard Technical Paper 1981.
123. Görler K., Mutter S., Westphal C. *Planta med.*, **37**, 308 (1979).

Предметный указатель

- Абсциссовая кислота 385, 423
Авидин 206
Аггликоны 646 и сл., 653 и сл., 658
Аденилсукцинат 464 и сл.
Аденилсукцинат-синтетаза 206, 232
Адеинин 451, 453 и сл., 469, 481
Аденогипофизарные гормоны 332
Аденозилкобаламин 630
Аденозин 453, 459 и сл., 464, 481
дифосфорибоза 481
5'-дифосфат 436 и сл., 464, 481
монофосфат 456 и сл., 464, 481
5'-трифосфат 456, 464
3'-фосфат-5'-фосфосульфат 457
5'-фосфосульфат 457
Адиновая кислота 632, 634
Адпок-Тгр-Lys-(Бос)-ОН 291
Адпок-Тгр-ОН 291
Адреналин 639
Адренокортикотропин 309
Адренокортикотропные гормоны см. АКТГ
Адреностерон 552 и сл.
Адсорбционная хроматография 33, 37 и сл.
Азелаиновая кислота 634
Азотистых оснований разделение 41
Актинидин 206
АКТГ 310 и сл., 326 и сл.
Алифатические кислоты
азотсодержащие 614
гидроксикарбоновые 614, 633
дикарбоновые 614, 632
оксокарбоновые 614, 618, 624, 633
Алкалоиды 660 и сл.
аконитиновые 664
индолы 663
морфиновые 661
пирролизидиновые 662
пуриновые 660
Алкаптоурия 623
Алкиладенины 468
Алкилгуанины 468
Алкилсульфонаты в ИП-ВЭЖХ 266
Алкилтиминны 468
Алкилцитозины 468
Алкоголь-дегидрогеназа 206, 248
Аллергены 206
Аллоза 438
Аллопуринол 481
Алоин 651
Альбумин 206, 225, 232 и сл., 245, 248
Альдегид-дегидрогеназа 206, 232
Альдиты 446
Альдозы 433, 439
Альдолаза 206
Альдоновые кислоты 433 и сл.
Альдостерон 551 и сл.
Альтроза 438
Алюминий оксид как неподвижная фаза 31
Амарогентин 655
Амаропанин 655
Амаросверин 655
Амиа-лаза 206
Амилоглюкозидаза 206
Амнионные белки 206
Аминобензоилглутамат 608 и сл.
2-Амино-3-гидроксibenzoилглицин 621
α-Амино-β-гуанидинопропионовая кислота 182
4-Амино-5-имидазолкарбоксамид 481
5-Аминоимидазолкарбоксамидорбозид 461 и сл., 481
Аминокислоты 63 и сл., 68 и сл., 171 и сл.
263–265, 345, 444 и сл., 461, 614, 628, 63
ДАБС- 188
дансил- 185 и сл.
ДНФ- 184
метаболизм 614
метаболиты 633
модифицированные 184 и сл.
производные
— ДАБТТ 196
— ИТГ 198
— НБД 188
— ФА 189
— ФТГ 190, и сл.
— ФТК 191
разделение 41
свободные 175 и сл.
УФ-спектры 218
энантиомерные 198 и сл.
Аминокислотный анализатор 264, 265
Аминопептидаза 206
Аминосакхара 180, 433, 444
Амиофазы 85 и сл.
Амины
алифатические 356, 363
ароматические 357
биогенные животных тканей и био
логических жидкостей 356, 360
Аммиак 444 и сл.
Анализ микроколичеств 26
Ангиотензины 206, 262, 344, 345
Андрогены 528 и сл.
удерживание 530 и сл.
1,4-Андростандион-3,17-дион 531
Андростандион 531
Андростандион 531
5α-Андростан-3,17-дион 531
Андростаны 528
Андростендиол 553
Андростендион 530 и сл., 550, 553 и сл.
Андрост-4-ен-3,17-дион 531
Андрост-4-ен-11,17-дион 529, 531
Андрост-4-ен-11β-ол-3,17-дион 530
Андростерон 529, 531
Антраксантин 384, 387, 390
Антигены 206
Антоцианидины 648 и сл.
Антраниловая кислота 481, 632, 637
Антрахиноны 651
Аповикамин 663
Аполипопротени 206, 232, 234
Апротинин 206, 345
Арабиноза 434, 442, 445
Арабинофуранозилурация 466
1-β-D-Арабинофуранозилцитозин 466, 472
Арбутин 651
Аргинин 345
Арилсульфатаза 206, 232
Аristoloxовые кислоты 53, 54
Аскорбиновая кислота 601 и сл.
D-Аскорбиновая кислота 603
Афиния хроматография
азотистых оснований, нуклеозидов,
нуклеотидов 459
аминокислот, пептидов, белков 248
Ацетил-CoA 629 и сл.
Ацетилхоллинэстераза 206
Ацетоацетил-CoA 636
17β-Ацетоксидандрост-4-ен-3-он 563, 566, 568
и сл., 572, 574
17β-Ацетокси-1-метиландрост-1-ен-3-он 563
17α-Ацетокси-6-метилпрегнан-4,6-диен-3,20-
дион 563

- 17 β -Ацетоксин-4-хлорандрост-4 ен-3-он 562.
666, 570, 574
17 β -Ацетоксин-6-хлорпегнан-4,6 диен-3,20-
диол 564
Ацетоксусная кислота 615, 624, 629, 633,
636
Ацидемия 629, 630
Ацидуря 630, 631
Ацил-CoA-дегидрогеназа 631
Ацилпереносящий белок 206
- Бактериородопсин** 206
Беклометазона дипропионат 560
Белки 171 и сл., 223 и сл.
 вирусные 210
 мембранные 209
 мозга 210
 молока 210
 мочи 210
 плазмы крови 210
 сои 210
 участвующие в свертывании крови 593
Белок
 Бенса Джонса 206, 214, 219
 ДНК-связывающий 207
 закодированный в аденовирусе 206
 кросс-реактивный 207
 яичный 232 и сл.
Безионилмезаконтин 664
3-Безионилксиэстран-1,3,5(10)-триен-17 β -ол
563, 566, 568, 572
3-Безионилксн-16 α ,17 β -диацетоксиэстра-
1,3,5(10)-триен 562
Безионная кислота 621
Бетаксантины 665
Беталаины 665
Бетаметазона
 17-валерат 560
 21-дигидрийфосфат 560
Бетанин 665
Бетацианины 665
Биогенные амины 350 и сл., 614, 620, 638
и сл.
 обнаружение 371, 373
Биотин 596, 629
Бис(триметилсилил)ацетамид 616
Бис(триметилсилил)трифторацетамид 616
Бипинхонийат натрия 434
Бок-Gly-OEt 292
Бок-Phe-Glu(OBzl)-Pro-NH₂ 283
Бомбезин 206, 264, 344 и сл.
Бпок-Pro-OH 292
Бразиликин 206, 262, 345
4-Бромметил-7-метоксикумарин 616
Бруции 663
Будесонид 560
трет-Бутилокскарбонильная группа (груп-
па Бок) 288 и сл.
Буфадиенолидные гликозиды 658, 659
Буфадиенолиды 658, 659
Буфанолиды 658
Буфотенин 350
- Вазоактивные белки кишечника** 210
Вазопрессин 210, 296, 345
 производные 294
Вазотоцин 210
Валепотриаты 654
17 β -Валерилокснэстра 1,3,5(10) т-иен 3-ол
562, 565, 568, 572
Валин 633
 метаболизм 625
Ван-Деефтера уравнение 22, 21, 29
Вандиллимидалная кислота 353, 358, 366
и сл., 376, 614, 620, 638
- Ванилиновая кислота** 620, 638 и сл.
Винкамины 663
Виолаксантин 384, 387, 390 и сл.
Витамины 578
 водорастворимые 595 и сл.
 жирорастворимые 389, 578 и сл.
 исследование в биологических объек-
тах 588, 606
Витамин А 389 и сл., 579 и сл., 584, *См. также* Ретинол
 производные 582, 584
Витамин В₁ 580, 592, 598, 608, *См. также*
Тиамин
Витамин В₂ 584, 597 и сл., 608, *См. также*
Рибофлавин
 фосфат 598
Витамин В₆ 598, 600 и сл., 608
 определение в пище и биологических
жидкостях 600
Витамин В₁₂ 580, 584, 592, 599, 603, 608
 дефицит 630
Витамин С 584, 592, 598, 608, *См. также*
Аскорбиновая кислота
Витамин D 391, 578, 582 и сл., 586 и сл.
 метаболиты 589
 метаболитов разделение 586
 структура 585
Витамин D₂ 583, 589 и сл.
Витамин D₃ 583 и сл.
Витамин Е 580, 584, 591 и сл. *См. также*
Токоеферол
 ацетат 580 и сл., 584 и сл.
 соединения группы 591
 сукцинат 584
Витамин К 386, 391, 578, 580, 593 и сл.
Витамин К₁ 384, 387, 388, 392, 593, 594
Витамин К₃ 580, 584, 592
Воски 420, 421
Время удерживания 10, 11
 «Высаливание» органических соединений
51
Высота, эквивалентная теоретической та-
релке 14, 28
Вязкость водно-органических смесей 52
Вязкость элюента 25
- Галактоза** 440 и сл.
Галактозамин 444 и сл.
 β -Галактозидаза 208, 242
Галактозилглицериды 417 и сл.
Галактолипиды 417 и сл.
Галактуроновая кислота 434, 447
Ганглиозид 385
Ганглиозиды 414 и сл.
 сахаров 442
Гардеропорфиринов эфиры 506
Гастрин 208, 262, 264
Гексафторизопропиловый эфир 617
Гексафтормасляной кислоты ангидрид 617
Гексокиназа 208, 262
Гель-проникающая хроматография 76 и сл.
 аминокислот 238
 липидов 442 и сл.
 неподвижные фазы для 79 и сл., 239
 оптимизация 80
 пептидов и белков 82, 238 и сл.
 углеводов 442 и сл.
Гель-эксклюзионная хроматография см.
Гель-проникающая хроматография
Гема биосинтез 489—491
 схема 520
Гемоглобин 208, 231 и сл., 245, 337, 338
Гемоллизат 499, 505, 523
Гемоцианин 208
Генистеин 646
Гентнобиоза 445
Гентионокриозиды 656

- Гентеиновая кислота 634
Гермакроноиды 655
Гиалуроноиды 208
Гибберелловая кислота 423
 производные 385
4-Гидразин-2-стильбазол 616
Гидрокортисон 562, 566, 572 и сл.
Гидрокортисона ацетат 566, 572 и сл.
3 α -Гидрокси-5 β -андростан-17-он 531
3 β -Гидрокси-5-андростен-17-он 531
3 β -Гидрокси-5 β -андростан-17-он 531
11 β -Гидроксиандростендион 552 и сл.
19-Гидроксиандростендион 552
14 α -Гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион 564, 566, 570, 574
17 α -Гидрокси-4-андростен-3-он 531
17 β -Гидроксиандрост-4-ен-3-он 564, 566, 568, 572
17 α -Гидрокси-21-ацетоксипрегн-4-ен-3,11,20-трион 564, 566, 568, 572
3-Гидроксibenzoилглицин 621
Гидроксibenзойная кислота 634
 β -Гидроксibутират-дегидрогеназа 615
Гидроксигиппуровая кислота 628
2-Гидроксиглутаровая кислота 631
18-Гидрокси-11-дегидрокортикостерон 552, 555
18-Гидроксидезоксикортикостерон 552
18-Гидрокси-11-дезоксикортикостерон 555
17 α -Гидрокси-20 α -дигидропрогестерон 553, 555
17 α -Гидрокси-20 β -дигидропрогестерон 553
11 β -Гидрокси-20 α -дигидропрогестерон 553
3-Гидроксидикарбоновые кислоты 637
3-Гидроксизобутирил-CoA 625
Гидроксизовалериановая кислота 624 и сл., 639
3-Гидроксизовалерил-CoA 626
3-Гидроксизоопановая кислота 631
2-Гидроксизокапроновая кислота 624, 626, 633
3-Гидроксизомасляная кислота 625, 633
5-Гидроксиндол 364
5-Гидроксиндолил-3-ацетальдегид 640
5-Гидроксиндолилуксусная кислота 350
5-Гидроксиндолил-3-уксусная кислота 353, 359, 367, 369, 375
 в моче 615, 620
 — спинномозговой жидкости 615, 620
Гидроксикарбоновые кислоты 619
6 β -Гидроксикортизол 551, 555
18-Гидроксикортикостерон 552, 555
3-Гидроксимасляная кислота 634
 β -Гидроксимасляная кислота 634
17 β -Гидрокси-17 α -метиладрост-1,4-диен-3-он 563, 566, 570, 574
17 β -Гидрокси-6 α -метил-17 α -(1-пропинил)-адрост-4-ен-3-он 564
3-Гидрокси-2-метилбутирил-CoA 627
2-Гидрокси-3-метилвалериановая кислота 627, 628, 633
3-Гидрокси-2-метилвалериановые кислоты 630
3-Гидрокси-3-метилглутаровая ацидурия 631
3-Гидрокси-3-метилглутарил-CoA 626
3-Гидрокси-3-метилглутаровая кислота 626, 631
3-Гидрокси-3-метилглутарил-CoA-лиаза 626
3-Гидрокси-2-метилмасляная кислота 627, 633
5-Гидроксиметил-2-фураикарбоновая кислота 621
5-Гидроксиметил-2-фурилглицин 621
17 β -Гидрокси-17 α -метилэстр-4-ен-3-он 564, 566, 568, 572
17 β -Гидрокси-17 α -метиниландрост-4-ен-3-он 564, 568, 572
3-Гидроксинпридин 602
3 α -Гидрокси-5 α -прегнан-20-он 549
3 α -Гидрокси-5 β -прегнан-20-он 549
20 α -Гидрокси-5 α -прегнан-3-он 549
3 β -Гидрокси-5 α -прегнан-20-он 549
3 β -Гидрокси-5 β -прегнан-20-он 549
20 α -Гидрокси-5 β -прегнан-3-он 549
20 β -Гидрокси-5 α -прегнан-3-он 549
20 α -Гидроксипрегн-4-ен-3-он 549
20 β -Гидроксипрегн-4-ен-3-он 549
3 β -Гидроксипрегн-5-ен-20-он 549
17 α -Гидроксипрегненолон 553
Гидроксипрогестерон 550, 553
4-Гидроксиретиновая кислота 583
Гидрокситестостерон 530, 552, 555
5-Гидрокситриптами 350, 373, 640
5-Гидрокситриптофаи 350, 353, 359, 375 и сл.
4-Гидроксифенилмолочная кислота 623
4-Гидроксифенилпириновиноградная кислота 623, 624
4-Гидроксифенилпируват-оксидидаза 623
Гидроксифенилуксусная кислота 634
2-Гидроксифенилуксусная кислота 623, 624
2-Гидроксизэстрадиол 534
6 α -Гидроксизэстрадиол 534
3-Гидроксизэстрон-1,3,5(10)-триен-17-он 562, 566, 570, 574
17 β -Гидроксизэстр-4-ен-3-он 563, 566, 568
6 α -Гидроксизэстриол 534
2-Гидроксизэстрон 534 и сл.
16 α -Гидроксизэстрон 534
17 β -Гидрокси-17 α -этилэстр-4-ен-3-он 564, 566, 568, 570
17 β -Гидрокси-17 α -этиниландрост-4-ен-3-он 563, 566, 572
17 β -Гидрокси-17 α -этинилэстр-4-ен-3-он 563, 566, 570, 574
Гидрофобное взаимодействие, влияние на удерживание 65, 67, 80
Гидрофобное углеродное число 413
Гидрофобность и порядок элюирования белков 338
 степень удерживания пептидов и пептидных гормонов 262
Гидрохинон 651
Гинзенозиды 656
Гипоксантин 453, 461, 464, 621
Гиппуровая кислота 481, 620 и сл., 628
 в моче 615
Гистамин 350, 354, 362
Гистон 208
Гликоальдегид 433
Гликозиды 433, 646 и сл. 654 и сл.
 дигиталиса 659
 различные 659
 сердечные 658
 флавоновые 648
 флавоноидные 648
Гликозилглицериды 417 и сл.
Гликолипиды 384, 406 и сл., 414 и сл.
Гликоль 446
Гликоля метаболиты 620
Гликольальдегид 433
Глицериды 393 и сл.
 разделение по «молекулярным видам» 401 и сл.
Глицериновая кислота 631
Глобин 225
 γ -Глобулин 232
 ϵ -(γ -Глутамил)лизин 208
Глутаровая кислота 634
Глумитонин 294, 295
Глюкагон 208, 262, 264, 338 и сл., 345
Глюканаза 208
Глюкоза 434, 445
Глюкозамин 444 и сл.
Глюкозоксидидаза 208, 238
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 208

- Глюкокортикоиды 553
 Глюконовая кислота 434
 Глюкуронидаза 208
 Глюкуроновая кислота 434, 447
 Гомоадиновая кислота 352, 358 и сл., 366, 374, 376, 620, 639
 Гомогенат печени 232
 Гомогентизоксидоза 624
 Гомогентизовая кислота 624
 Гомокарнозин 208
 Гомосерин 444
 Гомоцистин 182
 Гормон роста 208, 308 и сл., 331, 333 и сл., 338
 Гормоны гипоталамуса 266 и сл., 270
 другого происхождения 344
 поджелудочной железы 334
 Градиентное элюирование 21, 41, 42, 69
 и сл., 109 и сл.
 метиловых эфиров порфиринов 501
 флавоноидных гликозидов 649
 Гуаин 451, 453 и сл., 469, 481
 Гуаозин 453, 457 и сл., 481
 Гуаозин-5'-дифосфат 464 и сл.
 Гуаозинмонофосфат 481
 Гуаозин-5'-монофосфат 456 и сл., 481
 Гуаозин-5'-трифосфат 464
- Дайдзени 646
 11-Дегидроальдостерон 552, 555
 Дегидроаскорбиновая кислота 601
 11-Дегидрокортикостерон 552 и сл.
 21-Дегидропреднизолон 560
 7-цис-Дегидроретиналь 581
 9-цис-Дегидроретиналь 581
 13-цис, 11-цис-Дегидроретиналь 583
 7-Дегидрохолестерин 587 и сл.
 9,7-Дегидрохолестерин 587
 Дегидроэпиальдостерон 529 и сл., 553 и сл.
 6-Дегидроэстрадиол 534
 6-Дегидроэстрон 534
 Дезоксиаденозин 455, 459
 2'-Дезоксиаденозин 481
 Дезоксиаденозин-5'-монофосфат 455
 6-Дезоксигалактоза 441
 Дезоксигуаозин 455, 459, 481
 Дезоксигуаозин-5'-монофосфат 455
 2'-Дезоксиниозин 461, 481
 11-Дезоксикортизол 551 и сл., 557
 21-Дезоксикортизол 552 и сл.
 11-Дезоксикортикостерон 551 и сл.
 2-Дезоксирибоза 434
 Дезоксирибонуклеиновая кислота см. ДНК
 Дезоксирибонуклеозидмонофосфаты 455, 477
 Дезоксирибонуклеозиды 455, 459
 Дезоксисахара 433, 439
 Дезокситимидин 455, 461, 481
 Дезокситимидин-5'-монофосфат 455
 Дезоксцитидин 455, 459, 462
 Дезоксцитидин-5'-монофосфат 455
 17-Дезоксиэстрон 534
 Дексаметазон 552, 560
 Дельта-пептид сна 207
 Дельфинидин 647
 2-Деметилменахион-4 594
 Демокситонин 298, 305
 Денатурирование белков 51
 Дерморфин 207
 Детекторы 122 и сл.
 абсорбционные 129 и сл.
 вольтамперометрические 141 и сл.
 кондуктометрические 139
 кулонометрические 141 и сл.
 рефрактометрические 125 и сл.
 с линейной гребенкой фотодиодов 135
 - пересечной длиной волны 132 и сл.
- фиксированной длиной волны 131
 флуориметрические 135
 электрозахватные 617
 электрохимические 617
 Детергент в ВЭЖХ белков 229, 240, 242
 Детергентная хроматография биогенных
 аминов 367
 Диабет 631 и сл.
 Диабетический кетоацидоз 631
 Диазометан 616, 617
 Диаметр частиц эффективный 28
 2,3-Диаминонафталин 616
 1,5-Диаминопентан (кадаверин) 350, 353
 Диаминпропан 350, 353
 Дивалин 262
 14α, 17β-Дигидроксандрост-4-ен-3-он 565,
 566, 574
 6β, 17β-Дигидроксандрост-4-ен-3-он 565, 566,
 572
 17β, 17α-Дигидроксид-21-ацетокси-16α-метил-
 6α, 9α-дифторпрегна-1,4-диен-3,20-дион
 564
 11β, 17α-Дигидроксид-21-ацетоксипрегни-4-ен-
 3,20-дион 562, 566, 568, 574
 Дигидроксibenзойная кислота 634
 17α, 21-Дигидроксипрегни-4-ен-3,11,20-трион
 565, 566, 572
 3,4-Дигидроксифенилаланин 352, 369, 620,
 639
 3,4-Дигидроксифенилгликоль 639
 3,4-Дигидроксифенилгликольальдегид 639
 3,4-Дигидроксиминдальная кислота 353, 366
 и сл., 639
 2,5-Дигидроксифенилуксусная кислота 353,
 367 и сл.
 3,4-Дигидроксифенилуксусная кислота 352,
 358 и сл., 366 и сл., 375, 620, 639
 3,4-Дигидроксифенилэтанол 639
 20α-Дигидропрогестерон 553 и сл.
 20β-Дигидропрогестерон 553
 5α-Дигидротестостерон 553
 Дигидрофолевая кислота 607 и сл.
 17α-Дигидроэквилина 3-сульфат 537, 543,
 546, 547
 17α-Дигидроэквилин 534
 17α-Дигидроэквилина 3-сульфат 537, 540,
 543, 546
 Дигитоксигенин 658
 Диглицириды 398 и сл.
 л-нитробензоаты 408
 Дикарбоновые кислоты 617, 619, 633
 2-л-Диметиламинобензальдегид 584
 N,N-Диметил-5-гидрокситриптамин 350
 Диметилтарtrat 619
 N,N-Диметилтриптамин 350
 Диметилуриновая кислота 621
 Диметинин 262
 2,4-Динитрофенилгидразоны 616
 Диоксантин 390
 Динорфин 207
 Динуклеозидмонофосфаты 477
 3,17β-Дипропионилкоксистер-1,3,5(10)-три-
 ен 562
 Дисперсия 13 и сл.
 Дитерпеноиды 655
 Дитриптофан 262
 Дифиллин 461, 481
 Диффузия 16 и сл.
 вихревая 22
 коэффициент 16 и сл.
 продольная 16 и сл., 23
 2,7-Дихлорфлуоресцеин 619
 ДНК 451 и сл.
 продукты рестрикции 479
 Длительность разделения 26
 Додециламмония фосфат в ИПХ 266
 Додецилсульфат натрия, влияние на коэф-
 фициент емкости 368

- Доннана потенциал 65
 ДОФА 375
 Дофамин 351 и сл., 355, 358, 364, 368 и сл., 374, 375
 метаболиты 365
- Женьшеневые препараты 656
 Жидко-жидкостная хроматография на ионообменных смолах 437
 — неполярной неподвижной фазе 441
 углеводов 430 и сл.
 Жидко-твердофазная хроматография углеводов 429 и сл.
 Жирные кислоты 71, 392 и сл., 614, 619, 632
 биосинтез 614
 β- и ω-окисление 614
 β-окисление 632
 ω-окисление 632
 разделение диэфиров 393
 — эфиров 393 и сл.
- Зеаксантин 384, 388, 390
- 17-Изоальдостерон 552
 Изоаскорбиновая кислота 447, 603
 Изобутнирил-СоА 625
 Изовалериановая ацидемия 630
 Изовалериановая кислота 630
 Изовалерилглицин 628, 630
 N-Изовалерил-L-глутаминовая кислота 629, 630
 Изовалерил-СоА-дегидрогеназа 626
 Изокпропорфирин 509
 Изократическое элюирование производных порфиринов 503 и сл.
 Изократическое элюирование флавоноидных аглюконов 646
 Изолейцина метаболизм 627
 Изотаксистерин 587
 Изотопин 294
 Изотригидрогеназа 208
 Иммуноглобулин 208
 Иммуноглобулинов легкие цепи 219
 Индолы 365, 370, 373
 3-Индолиллантраниловая кислота 481
 Индолил-3-ацетамид 481
 Индолил-3-виноградная кислота 640
 Индолил-3-молочная кислота 481
 Индолил-3-пропионовая кислота 461, 481
 Индолилуксусная кислота 350, 377, 424, 621
 Индолил-3-уксусная кислота 481, 640
 Индольные алкалоиды 663 и сл.
 Инозин 453, 461, 464, 481
 Инозин-5'-монофосфат 457, 464
 Инсулин 208, 219, 225, 233 и сл., 338 и сл., 342 и сл.
 Интерферон 208, 230, 238
 Ионообменная хроматография 63 и сл., 217
 аминокислот 68, 178 и сл.
 белков 230 и сл., 232 и сл.
 биогенных аминов 360 и сл.
 жидко-жидкостная 437 и сл.
 классическая и ВЭЖХ 236
 на смолах в боратной форме 411
 оптимизация разделения 66
 пептидных гормонов 263
 пептидов 219
 порфиринов 516
 углеводов 431 и сл.
 Ионообменники 452
 на основе силкагеля 63
 — целлюлозы 535 и сл.
 Ионообменные смолы 437 и сл.
 Ион-парная хроматография 57 и сл., 603 и сл.
 аминокислот 175 и сл.
- влияние pH 61
 — состава элюента 61
 обращенно-фазовая 508 и сл.
 пептидных гормонов 266
- Кадаверин 350, 362
 Казенин 207
 β-Казоморфин 207, 345
 Кал
 определение порфиринов в 497 и сл., 500, 506, 511, 522
 схема выделения порфиринов из 495
 Калмодулин 206, 219
 Кальциневрин 206
 Кальцитонин 206, 337 и сл., 343 и сл.
 17α-Капнолоксипрегн-4-ен-3,20-дион 563, 566, 570, 574
 Капсаицин 665
 Карбоангидраза 207, 233 и сл., 337 и сл.
 Карбоксипептидаза 207
 Карденолиды 658
 Карнозин 182
 Каротин 384, 387, 390
 Каротиноиды 384, 389, 391, 592
 Каталаза 207, 225
 Катехины 370, 373
 метаболиты 359 и сл.
 Катехоламины 350 и сл., 357 и сл., 365 и сл., 373
 метаболиты 359, 361 и сл., 365
 радиоферментативные методы определения 354
 разделение методом ГХ 637
 Кетоацидоз 628, 631
 Кетогенеза схема 636
 Кетозы 433, 439
 11-Кетопрогестерон 552
 4-Кетотетраеновая кислота 583
 Кетотестрадиол 533
 16-Кетотестрадиол 534
 Кинуреновая кислота 461, 481
 Кислые конъюгаты
 глициновые 628
 глутаминовые 629
 Клобетазон
 бутират 560
 пропионат 560
 Клупенин 207
 Кодеин 661
 Коллаген 207, 219
 Колонка хроматографическая 22 и сл., 115 и сл.
 изготовление 115
 оптимизация работы 22
 проницаемость 25
 температура 120
 термостат 120
 торцевые соединения 116
 эффективность 24, 27
 Колхицин 665
 Колхицин 664, 665
 Константа
 адсорбции 37
 распределения 12
 Концентрирование пробы предварительное 92
 Копропорфирии 504, 510, 522, 523
 Копропорфириноген 520
 Копропорфирия врожденная 503 и сл., 521
 Кортизол 551 и сл.
 в плазме 557
 Кортизон 551 и сл., 562, 565, 566, 568, 572, 574
 ацетат 563, 566, 570, 574
 Кортиколиберин 267
 Кортикостероиды 551 и сл., 554 и сл.
 Кортикостерон 551, 554 и сл.
 Кортикотропин 309 и сл.

- Кортикотропина релизинг-фактор 207, 267
 Кофин 461, 481.
 Кофейная кислота 47
 Кофейные кислоты
 разделение производных 47
 Кофермент
 B₁₂ 630
 Q10 385
 Коэффициент
 емкости 12 и сл., 25, 38, 42, 263, 328,
 361
 — соединенный для оценочных испыта-
 ний 27
 разделения 19, 20
 Креатин 621
 Креатинин 621
 Креатинкиназа 207, 263
 Креатинфосфокиназа 207
 Крезол 591
 Крови анализ методом ВЭЖХ 374, 498
 и сл., 512, 515, 516
 Ксантин 453, 464, 481, 621
 Ксантоновые гликозиды 651
 Ксантозин 453, 461
 Ксантозина монофосфат 462, 464, 481
 Ксантоновый агликон из *Gentiana corym-*
bifera 651
 Ксантоны 650
 Ксантофиллы 388
 Ксилит 446
 Ксилоза 434
- Лактальбумин 208
 α-Лактальбумин 337
 Лакат-дегидрогеназа 208, 231 и сл., 234,
 615
 Лактоацитоз врожденный 631
 β-Лактоглобулин 208, 232 и сл., 337 и сл.
 Лактоза 434, 445
 Ланатозид 659
 Лаистерин 654
 Лейциламинопептидаза 208
 Лейцины 263
 Лейцины метаболизм 624, 626, 630
 Лекарственные средства стероидного ряда
 560 и сл.
 Лецитин 384
 яичного желтка 412
 Лигандообменная хроматография
 аминокислот, пептидов, белков 178
 Лигнаны 652
 Лизин-вазопрессин 295, 305
 Лизопрессин 209
 Лизоцим 209, 233, 247, 338
 яичного белка 335, 337
 Линейная скорость 12 и сл.
 Линолевая кислота 398, 399
 Липиды 383 и сл.
 из зеленых листьев кукурузы 418
 — — салата 419
 — печени и мозга крысы 411
 метилированные с поверхностью волос
 человека 402
 незрелых соевых бобов 402
 обнаружение 385
 полярные 406
 химическая структура 384
 разделение по «молекулярным видам»
 401
 Липоами-1-дегидрогеназа 209
 Липоксигеназа 208, 232, 248
 Липопротенин 208
 Липопротенины сыворотки крови 242, 246
 Липотропин 160, 208, 219, 308 и сл., 333
 и сл.
 Лупеол 654
 Люлиберин 267, 272
- производные 273 и сл.
 Люмистерин 585 и сл.
 Лютеин 384, 387 и сл.
- Малатдегидрогеназа 209
 4-Малеиллацетоуксусная кислота 624
 Мальвидин 647
 Мальтоза 434, 445 и сл.
 Мальтоолигосахариды кукурузного сиропа
 440
 Маннит 434, 446
 Манноза 434, 438, 445
 Масла
 разделение триглицеридов 401
 эфирные 421 и сл.
 Масло
 Cistus ladanifer 422
 хохобы 422
 Мезаконовая кислота 632
 Мезопорфирин 492
 Мезотоции 276, 294, 295
 Мезоэритрит 434
 Меланолиберин 267
 Меланостатин 268, 292
 N,N-диалкиламинафталинсульфо-
 производные 292
 производные 278 и сл., 300 и сл.
 Меланотонин 350
 Меланотропин 209, 262, 309
 Мелибнзоа 434, 445
 Мелиттин 209, 264, 343
 Мембранные белки 209, 242
 Менадион 594
 Менахинон 391, 594
 Мертвое время 28, 55
 Метаболизма нарушения 622
 — — врожденные 623
 Метаксин 598
 Металлопорфирины 492 и сл.
 Металлопротенины 242
 Металлотонионы 209
 Метанефрин 352, 355, 365 и сл., 368 и сл.,
 639
 Метиладенин 468, 469, 481
 N⁶-Метиладенин 468
 6-Метиладенин 461, 431
 3'-О-Метиладенин 474
 Метилладининовая кислота 632 и сл.
 Метиллакрилил-CoA 625
 2-Метиллацетоуксусная кислота 627
 2-Метилбутирил-CoA 627
 Метил-4-гидроксиретионат 584
 3-Метилглутаконовая кислота 626, 631, 632
 3-Метилглутарил-CoA 626
 Метилглутаровая кислота 631 и сл.
 Метилгуанин 469
 7-Метилгуанин 469, 481
 N²-Метилгуанин 481
 O⁶-Метилгуанин 469
 7-Метилгуанозин 461, 481
 N¹-Метилгуанозин 461, 481
 N²-Метилгуанозины 461, 481
 3-О-Метилдофамин 366
 Метилдолобуфигат 619
 Метилинозит 461 и сл.
 Метил-4-кеторетионат 584
 3-Метилкротоноилглицин 628 и сл.
 3-Метилкротоноилглицинурин 628
 Метилкротоноил-CoA 626
 3-Метилкротоноил-CoA-карбоксилаза 626
 7-Метилксантозин 461, 481
 Метиллимонная кислота 630
 Метилмалонил-CoA-мутаза 630
 Метилмалоновая ацидурия 630
 Метилмалоновая кислота 630
 семнальтегид 625
 Метилпимелиновая кислота 632

- 5-Метилпиримидин 481
 Метилпреднизолон 560
 Метилпроксовая кислота 632
 6-Метилпуриин 481
 Метилретиноат 584
 Метилстеарат 618
 Метилтетрагидрофолиевая кислота 609
 N⁶-Метилтетрагидрофолиевая кислота 609
 5'-Метилтиоадеозин 473
 Метилфенилацетат 619
 Метилцитидин 481
 Метилцитозин 468, 469
 5-Метилцитозин 453, 468
 Метилилтарная кислота 632, 634
 Метирапон 558
 Метирапоновый тест 557
 Метод «проходящего состава» 92
 3-Метокси-4-гидроксиминдальная кислота 365, 639
 3-Метокси-4-гидроксиуксусная кислота 639
 3-Метокси-4-гидроксифенилацетальдегид 639
 3-Метокси-4-гидроксифенилгликольальдегид 639
 3-Метокси-4-гидроксифенилгликоль 358, 359, 376, 620, 639
 3-Метокси-4-гидроксифенилуксусная кислота 365, 621
 3-Метокси-4-гидроксибензтанол 365
 3-Метокситирамин 352, 358, 365, 368
 3-Метокси-17 α -этинилэстра-1,3,5(10)-триен-17 β -ол 562, 566, 568, 572
 Минералокортикоиды 551
 Миоглобин 209, 232, 247, 337, 344
 Миозин 209
 Молочная кислота 615, 631
 Моноглутаматы 606
 Монодесоксисахариды 437 и сл.
 Монокарбоновые кислоты с длинной цепью 632
 Мононуклеарный клеточный фактор 209
 Моносахариды 439, 614
 Монотерпеновые глюкозиды 659
 Морфин 661
 Морфиновые алкалоиды 661
 Мотилин 209
 Мочи анализ методом ВЭЖХ 467, 494 и сл., 504, 509 и сл., 557 и сл., 602 и сл.
 Мочевая кислота 481, 615, 620 и сл.
 Муцины 209
- Наркотики** 661
Насосы 103 и сл.
 возвратно-поступательный 107 и сл.
 диафрагменный 108
 с пневматическим усилителем 106
 шприцевой 106
Нафталин как внутренний стандарт 584
 α -Нафтол как внутренний стандарт 591
Нейрогипофизарные пептидные гормоны 293 и сл., 296
Нейромедиаторы 638
Нейропептид Y 209
Нейротензин 209, 262, 264, 344, 345
Нейротоксин 209
 кобры 344
Неоксантины 384, 387, 390
Неподвижные фазы 10 и сл., 29
 жидкие 40 и сл.
 пористые 32
 с привитыми группами 30 и сл., 43 и сл.
Ниацинамид 598 и сл., 603
Ниацин 598
Нижний предел обнаружения 123
Никотинамид 481, 596, 605
Никотинамидадениндинуклеотид 461, 465
- α -Никотинамидадениндинуклеотид** 481
 β -Никотинамидадениндинуклеотид 461, 481
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат 457, 465, 481
Никотинамидмононуклеотид 481
Никотиновая кислота 596, 605
Нингдрин 445
Нингидриновый реагент 283
л-Нитробензальдегид как внутренний стандарт 581
л-Нитрофенилацетонитрил как внутренний стандарт 591
Норадреналин 639, 354 и сл., 363
Нормально-фазовая ВЭЖХ аминокислот, пептидов, белков 230
Норметанефрин 352, 355, 358, 364, 365, 376, 639
Норсинефрин 352, 368
19-Нортестостерон 563, 566, 568
Норэпинефрин 351, 355, 358, 363 и сл., 368, 375 и сл.
Нуклеозиды 41, 451 и сл.
Нуклеозидов разделение 41
Нуклеотиды 451 и сл.
- Обнаружение** 432 и сл.
 нижний предел 123
Обращенно-фазовая ВЭЖХ аминокислот, пептидов 224 и сл. белков 224 и сл., 229 биогенных аминов 364 лигнанов 652 пептидных гормонов 261 и сл. терпенов 653
Обращенные фазы, получение и свойства 43
Объем пор удельный силикагеля 31, 33
Объемная скорость 10 и сл.
Программирование 501
Объем элюирования 76 и сл., 81
Овальбумин 209, 223, 232, 235, 345
Овоингибитор 209
Овомукоид 209
Оксидаза D-аминокислот 206
Окситонин 209, 219, 262, 293 и сл., 305
 производные 298 и сл.
3-Оксовалериановая кислота 627
2-Оксоглутаровая кислота 631
2-Оксонивалериановая кислота 624, 625, 634, 636, 637
2-Оксонизокaproновая кислота 624, 626, 634, 636, 637
Оксикарбоновые кислоты 618 и сл., 624
 схема анализа 618
3-Оксомасляная кислота 634, 637
3-Оксо-2-метилвалериановая кислота 629
2-Оксо-3-метилвалериановая кислота 627, 628, 634, 636, 637
Олигодесоксирибонуклеотиды 483 и сл.
Олигонуклеотиды 475 и сл., 483
Олигосахариды 433, 437 и сл., 439
 восстанавливающие 433
 невосстанавливающие 433
Олигопептиды гипоталамуса 286
Олигосахаридов кукурузного сиропа разделение 440
Опнум сырой 661
Оптимизация условий разделения 52 и сл., 66
Органические кислоты
 в крови и моче 614
 как маркеры нарушений метаболизма 622
 выделение 615
 метилирование 617
 метиловые эфиры 617, 618
 методы модифицирования 617

- пентафторбензилловые эфиры 617
предварительное фракционирование 617 и сл.
триметилсилиловые эфиры 617 и сл.
Орнитин 209, 304, 305
Орнитин 444
Орозомуконд 209
Оротилин 461
Оротовая кислота 467
Основной белок миелиновых оболочек 209
- Палаудин 661
Пальмитиновая кислота 632
Паитотеиновая кислота 596
Папаверин 661
Параметры
разделения 11 и сл.
удерживания 11
Парвальбумин 209
Паранефрин 365
Парацитовидной железы гормон 209, 219, 337
Пентаалания 262
Пеонидин 647
Пепсин 209
Пептидные гормоны 215, 266 и сл.
Пептиды 201 и сл., 265, 295 и сл.
N-ацетилированные-перметилирован-
ные 206
вируса полимиелита 209
диастереомеры 221
защищенные 209
модифицированные 221
родственные АКГГ 206
синтетические 202, 210
фосфорилированные 208
Пептидный анализатор 282
Пероксидазы 209
Петунидин 647
Пигменты 386 и сл., 665
гороха 387
зеленых листьев ячменя 387
растительные 390
Пимелиновая кислота 634
Пик хроматографический
дисперсия 13
симметричность 28
ширина 13 и сл., 26
Пирен как внутренний стандарт 580
Пиридоксаль 600 и сл.
Пиридоксамин 600 и сл.
Пиридоксаминфосфат 606
Пиридоксин 596, 598, 599, 605
Пиридоксининовая кислота 602
Пиридоксол 600 и сл.
Пиридоксолфосфат 606
Пиримидиновые основания 451
Пировиноградная кислота 631, 634, 637
Пирролизидиновые алкалоиды 662 и сл.
Пируват-дегидрогеназа 631
Пируват-декарбоксилаза 631
Плазма 375, 467 и сл., 475, 500, 517, 558, 589, 590, 592
Пластохинон 384, 387 и сл., 391
Плацентарный лактоген человеческий 337, 338
Плотность упаковки (заполнения) 33, 36, 48
Поверхностно-активные ионы в ИП-ВЭЖХ 266
Подвижная фаза 10 и сл.
состав 110
Полиамин 350, 352, 356, 360 и сл., 363
Полнвитаминные препараты 598
Полнугидроксикарбоновые кислоты 616
Полнуглутаминовые производные 606
Полинуклеотидный синтез 483
Полиолы 433, 439, 446 и сл.
Полисахариды 433, 448
Полистерильные анионообменники 545
Порфириногексикарбоновых кислот эфиры 506
Порфиринов эфиры 494, 501 и сл.
метилловые 503 и сл.
метилэтиловые 505 и сл.
Порфириновые стандарты 509
Порфиринопентакарбоновые кислоты 516
Порфирины 489 и сл.
биосинтез 489, 491
из глубоководных медуз 513
— кала 495, 497, 511
— крови 512, 515
— мочи 495, 509, 513
— плазмы крови 517
методики разделения 500 и сл., 506, 508
свободные 496, 498, 499
состав 520 и сл.
Поры
диаметр 32, 34, 63
объем 77 и сл.
Послеколонное модифицирование 153
бидихонинатом меди 434
орсином 434
периодатом натрия 434
Послеколонные реакции 433 и сл.
Преальбумин 209, 232
Превитамин D 584, 585
Превитамин D₂ 585, 587
5 α -Прегнан-3 α ,20 α -диол 549
5 α -Прегнан-3 α ,20 β -диол 549
5 α -Прегнан-3 β ,20 α -диол 549
5 α -Прегнан-3 β ,20 β -диол 549
5 β -Прегнан-3 α ,20 α -диол 549
5 β -Прегнан-3 α ,20 β -диол 549
5 β -Прегнан-3 β ,20 α -диол 549
5 β -Прегнан-3 β ,20 β -диол 549
Прегн-5-ен-3 β ,20 α -диол 549
Прегн-5-ен-3 β ,20 β -диол 549
Прегнан-4-ен-3,20-диол 566, 572
Прегн-5-ен-3,20-диол 549
5 α -Прегнан-3,20-диол 549
5 β -Прегнан-3,20-диол 549
9 β ,10 α -Прегнан-4,6-диен-3,20-диол 563
Прегн-4-ен-20 β -ол-3-он 550
Прегненолон 550
Предколонка в биохимических анализах 34
Предколонное модифицирование 153
Преднизолон 552, 557 и сл., 565, 570, 574
Преднизол 552, 557 и сл.
Пренилхиноны 386 и сл.
природные
— производные 391
Преклолы 383 и сл.
Препаративная жидкостная хроматография 139
Препаративное разделение 159 и сл., 168
ЖХ 162
Пробковая кислота 632, 634
Провитамин A в томатах 578
Провитамины D₂ 583, 587
Прогестерон 550, 563, 564, 568, 570
Прогестины 548
Пролактин 308, 331, 337 и сл.
Пролактолиберин 267
Пролактостатин 268
Пролитгидроксалаза 209
Проницаемость колонки 25 и сл., 27
Пропагин 598
Пропиокортин 209
Пропионилглицин 628
Пропионил-CoA 627—630
Пропионил-CoA-карбоксилаза 629
17 β -Пропионилксандрол-4-ен-3-он 565, 566, 568 и сл., 574
17 β -Пропионилксон-4-хлорандрост-4-ен-3-

- он 565, 566, 570, 574
 Пропионовая кислота 628, 629
 Пропионовая кислота 629
 Протеиназа плесневых грибов 209, 232
 Протеиназа ингибитор 209
 α1-Протеиназы ингибитор 209
 Протеиназа 209
 Противоионы в ИПХ 57 и сл., 91, 266
 влияние на удерживание 60
 Протопорфирин 512, 515
 Протопорфирин 510 и сл.
 Протромбин 210, 242, 593
 Псевдоуридин 467, 481, 621
 Птеридинового кольца степень окисления 606
 Пуриин 481
 Пуриновые алкалоиды 660
 2'-дезоксирибонуклеотиды 462
 основания 451
 рибонуклеотиды 462
 Пуририбозид 481
 Путресцин 350, 354, 362
 рН 33 и сл., 56, 61 и сл., 64 и сл.
- Радноферментативный метод 355**
Разделительные системы
 выбор 88
 с разделением потока 92 и сл.
Размывание (зоны) 13 и сл., 23 и сл.
 механизм 22
 послеколоночное 25
Разрешение
 Рамноза 434, 445
 Рамантензин 210
Распределительная хроматография 40 и сл.
 белков 230
 жидко-жидкостная 41
 ион-парная 41
Распределительные системы с полярными твердыми фазами 40
 Растительные гормоны 385, 421 и сл.
 Растительные метаболиты 645 и сл.
 Растительные фенольные соединения 646 и сл.
Реагенты для послеколоночного модифицирования 433
Реактор
 спиральный 437
 трубчатый 156
Ретиналь 389, 582
 изомеры 582
 полностью *транс* 581
Ретиниловые эфиры 389, 584
Ретининовая кислота 389, 583
 полностью *транс* 583
Ретининовой кислоты ароматической аналог 583
Ретинониды ароматические 583
Ретинол 389, 578 и сл.
 полностью *транс* 580
Ретрорсин 662
 Рибоза 451, 434
Рибонуклеаза 210, 219, 229, 262, 263, 337 и сл., 344
Рибофлавин 481, 597 и сл., 600. См. также Витамин В₂
Рибофлавинмонофосфат 608
РНК 451, 470, 471, 482
 модифицированные компоненты 468
 фрагменты 480
РНКаза 210
тРНК 471, 480
Ротенон 653
Рыбных продуктов ВЭЖХ 587
- Сахара 85**
 амина 180, 433, 444 и сл.
 нейтральные 180
 разделение стандартной смеси 434
 фосфаты 433, 447
 Сахарининовые кислоты 433, 447
 Сахарные кислоты 433, 447
 Сахароза 434, 445
 Секоирридоидные гликозиды 654
Селективность
 разделения 38 и сл., 42
 — изменение после обработки ГМДС 45
 Силаиольные группы 35, 42
 модифицирование 43
 Силикагель в ВЭЖХ 31 и сл.
 виды 33
 разделение на 35
 свойства 33
 Силоксановые группы 35
 Синактен 210
 Синефрин 352, 368 и сл.
Системы ввода пробы 113 и сл.
 — — автоматические 114
 смещения растворителей 102 и сл., 110 и сл.
 Соевый ингибитор трипсина 233
 Соматолиберин 267
 Соматостатин 210, 262, 264, 279, 283
 производные 279
 синтез 288
Соматотропин 309
 Сорбит 434, 446
 Спермидин 350, 353, 356, 362
 Спермин 350, 353, 356, 362
 Спинномозговая жидкость 442, 641
 Спинномозговой жидкости экстракт 641
 Спирты 420 и сл.
 Стабильность потока 103 и сл.
 Стероидные гормоны 528 и сл.
 определение в биологических жидкостях 554 и сл.
 Стероидов разделение 39, 41
 Стероидные гликозиды 654
 Стероидных гормонов определение в биологических жидкостях 554 и сл.
 Стероиды 561, 568, 572
 коры надпочечников 554
 Стоксов радиус 84
 Стрихинин 663
 Сукцинил-СоА 630
 Сульфолитид 417
 Сульфотрансфераза 458
 Сфингомиелин 411, 414
- Тауриин 182, 444**
Тафции 210, 262
Тахистерол 584 и сл.
Тебаин 661 и сл.
Теобромин 461, 660
 Теоретическая тарелка, понятие 14
 Теофиллин 461, 481, 660, 661
 Терпеноиды
 агликоны 653
 гликозиды 654
Терпеноиды 383 и сл., 391, 653
 производные 420 и сл.
Тестикулярные стероиды 555
Тестолактон 560
Тестостерон 528 и сл., 550, 553, 555 и сл., 564, 566, 568
 β-D-глюкурин 536, 538, 539, 543, 544, 547
 сульфат 536, 538, 539, 543, 544, 564
 11β,16α,21-Тетрагидроксиг-9α-фторпрегнан-1,4-диен 3,20-дион 562

- Тетрагидрофольевая кислота 608 и сл.
 Тетразолсульфоновая кислота 433
 Тетраоксактид 345
 Тетранортрипеноиды 655
 Тиамин 596 и сл., 599 и сл. *См. также* Витамин В₁
 дифосфат 598 и сл.
 монофосфат 598 и сл.
 трифосфат 598 и сл.
 Тиаминсвязывающий белок 210
 Тимидин 453, 459, 464
 Тимидиндифосфат 464
 Тимидинмонофосфат 464, 481
 Тимидинтрифосфат 464
 Тимин 451, 453 и сл., 455, 464, 481
 Тимопоэтин 210
 Тимопоэтинактивный фрагмент 345
 Тioxромная реакция 596
 Тирамин 352, 364, 366, 368 и сл., 375
 Тиреоидный связывающий белок 210
 Тиреолиберин 267 и сл., 269 и сл.
 Тиреотропин 210, 309 и сл.
 Тиреотропина рилизинг-фактор 210, 267
 Тирозин 263, 376, 444 и сл., 614, 623 и сл.
 Тирозиназа 210
 Тирозингидроксилаза 620
 Тирозина метаболитов очистка 358
 Тирозисульфат 263
 Токол 579
 Токотриенолы 391 и сл., 591 и сл. *См. также* Витамин Е
 Токоферол 385, 579, 591
 Токоферолы 591 и сл. *См. также* Витамин Е
 Токохинон 385, 391
 Трансферин 210, 232
 Трансформирующий фактор роста 233
 Трегалоза 445
 Триамцинолонаацетонид 560
 1,24,25-Тригидроксивитамин D 585
 11 β ,17 α ,21-Тригидроксис-6 β -метилпрегн-1,4-диен-3,20-дион 565, 566, 570, 574
 11 β ,17 α ,21-Тригидроксис-16 α -метил-9 α -фтор-прегн-1,4-диен-3,20-дион 562, 566, 570, 574
 11 β ,17 α ,21-Тригидроксис-16 β -метил-9 α -фтор-прегн-1,4-диен-3,20-дион 566, 570, 574
 11 β ,17 α ,21-Тригидроксипрегн-1,4-диен-3,20-дион 566, 570
 11 β ,17 α ,21-Тригидроксипрегн-4-ен-3,20-дион 565, 566, 570, 574
 17 β ,17 α ,21-Тригидроксипрегн-4-ен-3,20-дион 568 и сл.
 Триглицериды 398 и сл.
 Триглицин 262, 628
 Тригонеллин 621
 Триуклеозилдифосфат 478
 Триозофосфатизомеразы 210
 Трипсин ингибитор 210, 232
 Триптамин 350, 373
 метаболиты 359
 Тритерпеноиды 654 и сл.
 Триптофан 263, 343, 350, 359, 376, 641
 Трифторуксусной кислоты ангидрид как γ -агент-модификатор 617
 тРНК *см.* РНК
 Тройные смеси растворителей в распределительной ВЭЖХ 40
 Убихинон 385 и сл.
 Углеводороды 420 и сл.
 Углеводы 429 и сл.
 ацетали 448
 гликозиды 448
 ГПХ 442
 ЖЖХ 430 и сл.
 ИОХ 431 и сл., 437 и сл.
 обнаружение 432
 — послеколлоночные реакции 433
 — по физическим свойствам 432
 ОФХ 441
 Удельная поверхность силикагеля 31 и сл., 33
 Удерживаемый объем 10 и сл.
 лекарственных препаратов стероидов 562 и сл.
 Удерживание
 влияние воды на 39
 изменение 40
 механизм 30 и сл.
 Уравновешивание колонки элюентом 52
 Урацил 451, 453, 456, 461 и сл., 465
 1- β -D-Урациларабинозид 472
 Уреазы 210, 232, 242
 Уридин 453, 459 и сл., 464, 467
 5'-дифосфат 464
 5'-монофосфат 462, 464, 481
 5'-трифосфат 464
 Уридиндезоксисуридин 462
 Уридиндифосфатгалактоза 465
 Уридиндифосфоглюкоза 481
 Урокановая кислота 620 и сл.
 Урокиназа 210, 242, 246
 Уроновые кислоты 433, 447
 Уропорфирин 497, 500, 505 и сл.
 изомеры 514
 октаметилловые эфиры 508
 Уропорфириноген 520
 Уропорфириноген-декарбоксилаза 520, 521
 Уропорфириноген-коксилаза 520
 Уропорфобилиноген-синтаза 520, 521
 Уротензин 210
 Фазы, участвующие в переносе заряда 85
 Фактор, индуцированный беременностью 207
 Фактор переноса человеческого 210
 Фактор роста опухолевых клеток 210
 Фактор элонгации 207
 Фарнезол 432
 Феллпрессии 207, 294, 304
 Фенилаланина метаболиты 624
 Фенилаланин-4-гидроксилаза 614, 623 и сл.
 β -Фениламинны 356
 N-Фенилацетилглутамин 629
 N-Фенилацетилглутаминимид 629
 o-Фенилацетилглутаминовая кислота 629
 o-Фенилкарбонил 616
 Фенилкетонурия 623
 Фенилпировиноградная кислота 614 и сл., 623, 634
 17 β -[β -(Фенилпропионилокси)]-эстр-4-ен-3-он 563, 566, 568, 572
 Фенилуксусная кислота 634
 β -Фенилэтиламин 354, 361, 363
 Фенолы 373, 614
 Феофитин 387, 390
 Ферритин 207, 345
 Фетунин 208, 226
 Фибриноген 208, 212, 226
 Фибриногенпептид 208, 212
 Фиброэктин 208
 Физалоемин 209, 262
 Филлохинон 384, 594. *См. также* Витамин К₁
 Флавинадениндинуклеотид 457, 481
 Флавиомононуклеотид 481
 Флавоны 646
 Флуктуация потока растворителя 104
 Флуорескамин 265 и сл., 293, 306 и сл.
 Фолиевая кислота 598 и сл., 606 и сл.
 Фоллиберин 267
 Формазаны 433
 Формальдегид 433, 437
 N⁵-Формилтетрагидрофольевая кислота 608,

- 609
10-Формилтетрагидрофолиевая кислота 609
Формозы разделение 447
Фосфатаза щелочная 209
Фосфатидилглицерид 384
Фосфатидилмноинэзит 384
Фосфатидилхолин 384
из печени крысы 413
Фосфатидилэтаноламин 384
3-Фосфоглицераткиназа 209
Фосфолипидные стандарты 410
Фосфолипидов разделение 41
Фосфолипиды 41, 384, 406 и сл.
из амнотической жидкости 411
немодифицированные 408
получение производных 407
Фосфорилаза 209
Фосфорилированные пептиды 209
Фосфэтаноламин 182
Фриделин 654
Фруктоза 434 и сл., 442, 443, 445
Фруктозо-1,6-дифосфатазы 631
Фталевый альдегид 189, 293
5-Фтор-2'-дезоксигуанидин 474
Флюорокортизона ацетат 560
Фторопиримидин 466
3-Фторурацил 474, 481
Фукоза 438, 440, 443
4-Фумарилацетогуксусная кислота 624
Фумаровая кислота 617, 631
Фуранокарбиновые кислоты 614
17 β -[8-(2-Фурилпропионилуксн)]-эстра-
4-ен-3-он 566, 568, 572
2-Фурилглицин 621
- Хелаты
в ВЭЖХ 63
порфиринов 499, 504
Химически привитые фазы 42 и сл.
Химотрипсин(оген) 207, 229, 233
 α -Химотрипсиноген А 345
Хиральные фазы 87
Хлорофилл 386 и сл., 418, 489
эфир 389
Хлорфенолы 56
Холестана структура 529
Холестерин 242, 411, 553
Холестероиды 207
Холин 242, 354
Холокарбонил-синаптаза 629
Хорионический гонадотропный гормон 207,
338
Хроматограф жидкостной, схема 101
Хроматография обращенно-фазовая 42
Хроматография, определение 10
Хромато-масс-спектрометрия с ионизацией
электрическим полем 285
Хромаффинные клетки 638
- Целлюлоза 434, 445
Целлюлаза 207, 262
Церамиды 414 и сл.
Цереброзиды 384, 414
Церулеин 206, 262
Цианидин 647
3',5'-Циклоаденозинмонофосфат 481
3',5'-Циклогуанизинмонофосфат 481
3',5'-Циклоинозинмонофосфат 481
3',5'-Циклоуридинмонофосфат 481
Цинхонин 664
Цитидин 453, 461 и сл.
Цитидин-5'-дифосфат 464 и сл.
Цитидин-5'-монофосфат 464 и сл.
Цитидин-5'-трифосфат 464 и сл.
Цитозинарибоза 472 и сл.
Цитозин 451, 453 и сл., 459 и сл., 464, 481
Цитохром 207, 242, 337
Цитохром-с-оксидаза 631
Цитраконовая кислота 632 и сл.
Цитрулин 182
- Частицы неподвижной фазы
диаметр 22 и сл.
распределение по диаметрам 27
форма 27
эффективный 28
- Число
теоретических тарелок 14, 22
эффективных теоретических тарелок
15
- Эквивалент 534
3-сульфат 543, 546
Эквивалент 534
3-сульфат 540, 543, 546
Эластаза 335, 338
Элеонидин 207, 262
Элюент
влияние состава 49 и сл., 61, 71
выбор 37
поверхностное натяжение 326
Элюирующие смеси 50
Элюирующая способность 37 и сл., 68 и сл.
смесей растворителей 38
Элюотропные ряды 37
Эмульгатор 401 и сл.
Эндорфин 207, 262, 264, 334, 345
Энкефалин 207
Эндефалитогенные пептиды 207
Эпиадростерон 529 и сл.
Эпивинкамин 663
14-Эпивинкамин 663
Эпинефрин 351 и сл., 355, 358, 366, 368
и сл., 375
Эпитестостерон 351
Эпинефрин 529 и сл.
5,6-Эпоксилютеин 390
2,3-Эпоксимахион-4 593
Эрабутоксин 207
Эргокристалл 664
Эргокристин
Эргостерин 585
Эритроциты 466 и сл.
Эстрадиол 533 и сл., 538, 553, 560, 563, 566,
568 и сл., 572 и сл.
17 β -Эстрадиол
3- β -D-глюкуронид 536, 539 и сл., 542
и сл.
17- β -D-глюкуронид 536 и сл., 539, 543,
544
543, 545
3,17- β -D-диглюкуронид 536 и сл., 540,
3,27-дисульфат 537 и сл., 540, 543
и сл.
3,17-дифосфат 536 и сл., 539 и сл., 543
конъюгаты 493 и сл., 540
3-сульфат 536 и сл., 540, 543, 546
3-сульфат-17- β -D-глюкуронид 537, 540,
543
17-сульфат 537 и сл., 540, 543, 546
3-фосфат 536, 537 и сл., 540, 543, 544
и сл.
17-фосфат 537, 539, 543
Эстра-1,3,5(10)-триен-3,16 α ,17 β -триол 565,
566 и сл., 572
Эстриол 533 и сл., 538, 552, 560, 562, 566,
568, 572
Эстриола
 β -D-глюкуронид 539

- 3- β -D-глюкуронид 536, 542, 543
 16- β -D-глюкуронид 536, 539, 543, 545
 17- β -D-глюкуронид 536, 539, 543, 545
 и сл., 548
 3,7-дисульфат 537, 539, 543
 3,17-дисульфат 537
 16,17-дисульфат 537, 539, 543
 3-сульфат 537 и сл., 543, 546
 17-сульфат 540, 542, 546 и сл.
 3-фосфат 542
- Эстрогена
 глюкурониды 533, 543 и сл.
 конъюгаты 533 и сл., 536, 538 и сл.,
 542
 сульфаты 533
 фосфаты 533
- Эстрогены 532 и сл.
- Эстрон 533, 534, 538, 553, 560, 562, 566, 570,
 574
- Эстрона
 β -D-глюкуронид 536, 538, 539, 543, 545
 3-сульфат 536 и сл., 539, 540, 543, 546,
 547
 3-фосфат 536 и сл., 542 и сл.
- Этаволамин 182
- Этилбензоат как внутренний стандарт 584
- 17 α -Этилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол 562
- 17 α -Этинилэстра-1,3,5(10)-триен-3,17 β -диол
 566, 568 и сл., 572
- Этиндиола диацетат 560
- Этиохоланон 484 и сл.
- Эупол 654
- Эффективность колонки 23, 24, 27, 28
- Эффективность разделения по методу
 ВЭЖХ 26
- «Эффект памяти» в ОФ-ВЭЖХ белков 229
- Янтарная кислота 630 и сл.

Оглавление

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие	8

1. Основы теории и основные понятия хроматографии

К.-П. Хуне

1.1. Введение	10
1.2. Удерживание	10
1.3. Разделение	13
1.4. Дисперсия	13
1.4.1. Процесс размывания зоны	13
1.4.2. Уравнение Ван-Деемтера	16
1.5. Разрешение	18
Литература	21

2. Хроматографическая колонка

Х. Энгельгард, Х. Мюллер, У. Шён

2.1. Механизм размывания зоны	22
2.1.1. Введение	22
2.1.2. Оптимизация работы колонки	22
2.1.3. Оценка эффективности колонки	27
2.2. Механизм удерживания	30
2.2.1. Введение	30
2.2.2. Характеристики силикагеля	31
2.2.3. Разделение на силикагеле	35
2.2.4. Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ)	42
2.2.5. Вторичные равновесия в обращенно-фазовой хроматографии	57
2.2.6. Ионообменная хроматография	63
2.2.7. Градиентное элюирование	69
2.2.8. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)	76
2.2.9. Неподвижные фазы, имеющие функциональные группы	84
2.2.10. Выбор разделительной системы	88
2.2.11. Соединение разделительных систем (система с распределением потока по колонкам)	92
Литература	96

3. Аппаратура

К.-П. Хуне, Г. Розинг, Х. Шренкер

3.1. Введение	100
3.2. Система подачи растворителя	102
3.2.1. Хранение растворителя	102

3.2.2. Насосы для подачи растворителя	103
3.2.3. Смешение растворителей и системы формирования градиента	109
3.3. Ввод пробы	112
3.3.1. Общие соображения	112
3.3.2. Типы систем ввода пробы	113
3.3.3. Автоматические системы ввода пробы	114
3.4. Хроматографическая колонка	115
3.4.1. Трубки, используемые для изготовления колонок для ВЭЖХ	115
3.4.2. Торцевые соединения колонок	116
3.5. Термостат колонки	120
3.5.1. Стабильность температуры колонки и точность определения времени удерживания	120
3.5.2. Температура колонки и длительность анализа	120
3.5.3. Температура колонки и селективность	121
3.5.4. Конструкции термостатов для колонок	121
3.6. Детекторы	122
3.6.1. Некоторые общие понятия	123
3.6.2. Рефрактометрический детектор	125
3.6.3. Абсорбционные детекторы, работающие в УФ- и видимой области	129
3.6.4. Флуориметрический детектор	135
3.6.5. Электрохимические детекторы	138
3.6.6. Обнаружение с использованием химических реакций	152
3.7. Препаративное разделение	159
3.7.1. Введение	159
3.7.2. Области применения и условия разделения	160
Литература	169

4. Аминокислоты, пептиды, белки

Ф. Лотшпайх, А. Хеншен

4.1. Аминокислоты	171
4.1.1. Введение	171
4.1.2. Свободные аминокислоты	175
4.1.3. Модифицированные аминокислоты	184
4.1.4. Энантиомерные аминокислоты	198
4.2. Пептиды	201
4.2.1. Введение	201
4.2.2. Немодифицированные пептиды	205
4.2.3. Модифицированные пептиды	221
4.3. Белки	223
4.3.1. Введение	223
4.3.2. Обращенно-фазовая хроматография	224
4.3.3. Нормально-фазовая хроматография	230
4.3.4. Ионообменная хроматография	230
4.3.5. Гель-проникающая хроматография	238
4.3.6. Аффинная хроматография	248
4.4. Заключение	249
Литература	249

5. Пептидные гормоны

В. Вёльтер

5.1. Введение	261
5.2. Принципы разделения	261
5.2.1. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)	261
5.2.2. Ионообменная хроматография	263

5.2.3. Ион-парная высокоэффективная жидкостная хроматография	266
5.3. Разделение пептидных гормонов методом ВЭЖХ	266
5.3.1. Гормоны гипоталамуса	266
5.3.2. Нейрогипофизарные пептидные гормоны	293
5.3.3. Аденогипофизарные гормоны	309
5.3.4. Гормоны поджелудочной железы	338
5.3.5. Гормоны другого происхождения	344
Литература	346

6. Биогенные амины

К. Зех

6.1. Введение	350
6.2. Методы подготовки проб	356
6.2.1. Биогенные амины животных тканей и биологических жидкостей	356
6.3. Колоночная жидкостная хроматография биогенных аминов	360
6.3.1. Ионнообменная хроматография	360
6.3.2. Обращенно-фазовая и распределительная хроматография	363
6.4. Принципы обнаружения	370
6.4.1. Измерение природной флуоресценции	370
6.4.2. Окрашенные и флуоресцентные производные	371
6.4.3. Электрохимическое обнаружение	372
6.5. Применение	374
Литература	377

7. Липиды

М. Тевини, Д. Штайнмюллер

7.1. Введение	383
7.2. Пигменты и пренилхиноны	386
7.2.1. Витамин А	389
7.3. Жирные кислоты	392
7.4. Глицериды (моно-, ди- и триглицериды)	398
7.4.1. Глицериды различных классов	401
7.4.2. «Молекулярные виды»	401
7.5. Фосфолипиды и гликолипиды	406
7.5.1. Фосфолипиды	406
7.5.2. Гликолипиды	414
7.6. Углеводороды, спирты, воски, производные терпеноидов	420
7.6.1. Углеводороды и липофильные спирты	420
7.6.2. Воски, эфирные масла, терпеноидные растительные гормоны	421
Литература	424

8. Углеводы

Г. Бауэр, В. Вельтер

8.1. Введение	429
8.2. Общие методики	429
8.2.1. Жидко-твердофазная хроматография	429
8.2.2. Жидко-жидкостная хроматография	430
8.2.3. Ионнообменная хроматография	431
8.3. Обнаружение	432
8.3.1. Обнаружение по физическим свойствам	432
8.3.2. Послеколонные реакции	433
8.4. Монодезоксиды и олигосахариды	437
8.4.1. Жидко-жидкостная хроматография на ионообменных смолах	437

8.4.2. Жидко-жидкостная хроматография на силикагеле с нанесенной <i>in situ</i> или привитой полярной фазой	439
8.4.3. Жидко-жидкостная хроматография на неполярной неподвижной фазе, обращенно-фазовая хроматография	441
8.4.4. Ионообменная хроматография на смолах в боратной форме	441
8.4.5. Гель-проникающая хроматография (ГПХ)	442
8.5. Аминсахара	444
8.6. Альдиты	446
8.7. Сахарные кислоты	447
8.7.1. Уроновые кислоты	447
8.7.2. Альдоновые, сахарные и сахариновые кислоты	447
8.8. Фосфаты сахаров	447
8.9. Гликозиды, простые и сложные эфиры, ацетали	448
8.10. Полисахариды	448
Литература	449

9. Азотистые основания, нуклеозиды, нуклеотиды

Г. Шотт

9.1. Введение	451
9.2. Методы разделения азотистых оснований, нуклеозидов и мононуклеотидов	452
9.2.1. Ионообменники	452
9.2.2. Обращенная фаза	454
9.2.3. Аффинная хроматография	458
9.2.4. Растворимые комплексы металлов	459
9.3. Анализ компонентов нуклеиновых кислот в биологических объектах	460
9.3.1. Отдельные нуклеозиды и мононуклеотиды	460
9.3.2. Азотистые основания, нуклеозиды и мононуклеотиды	463
9.3.3. Модифицированные компоненты ДНК и РНК	468
9.3.4. Цитозинарабиноза и метаболиты	472
9.3.5. Модифицированные адениннуклеозиды	473
9.3.6. 5-Фторурацил и 5-фтор-2'-дезоксисуридин	474
9.4. Разделение олиго- и полинуклеотидов	475
9.4.1. Олигонуклеотиды	475
9.4.2. Олигонуклеотиды с изомерными последовательностями	476
9.4.3. Продукты рестрикции ДНК	479
9.4.4. Фрагменты РНК	480
9.4.5. тРНК	480
9.4.6. Анализ последовательности олигонуклеотидов и РНК	482
9.5. Применение хроматографии в полинуклеотидном синтезе	483
Литература	485

10. Порфирины

Г. Мейер

10.1. Введение	489
10.1.1. Биосинтез порфиринов	489
10.1.2. Аналитические методы (исключая ВЭЖХ)	490
10.1.3. Химические и физико-химические свойства	492
10.2. Методы подготовки проб	494
10.2.1. Моча	494
10.2.2. Кал	497
10.2.3. Кровь, ткани и другие объекты	498
10.3. Методики разделения	500
10.3.1. Разделение эфиров порфиринов	501

10.3.2. Разделение свободных порфиринов	508
10.4. Обнаружение	518
10.4.1. УФ-поглощение	518
10.4.2. Флуоресценция	518
10.5. Применение ВЭЖХ для диагностики порфирий	520
10.5.1. Состав порфиринов при порфириях	520
10.5.2. Рекомендации для выбора метода лабораторного диагно- стирования	524
Литература	525

11. Стероидные гормоны

В. Вёльтер

11.1. Введение	528
11.2. Андрогены и андростаны	528
11.3. Эстрогены	532
11.4. Прогестины	549
11.5. Кортикостероиды	551
11.6. Определение стероидных гормонов в биологических жидкостях	554
11.7. Исследование лекарственных средств стероидного ряда методом ВЭЖХ	560
Литература	576

12. Витамины

Т. Кронбах, В. Вёльтер

12.1. Жирорастворимые витамины А, D, Е и К	578
12.1.1. Витамин А (ретинол)	578
12.1.2. Витамин D и родственные соединения	582
12.1.3. Витамин Е (токоферолы и токотриенолы)	591
12.1.4. Витамин К	593
12.2. Водорастворимые витамины	595
12.2.1. Витамин В ₁ (тиамин)	596
12.2.2. Витамин В ₂ (рибофлавин)	597
12.2.3. Витамин В ₆ (пиридоксиновая группа)	600
12.2.4. Витамин С (аскорбиновая кислота)	601
12.2.5. Никотиновая кислота	605
12.2.6. Фолиевая кислота	606
12.3. Исследование витаминов в биологических объектах	606
Литература	610

13. Органические кислоты в организме человека

Х. Либих

13.1. Введение. Органические кислоты и медицина	614
13.2. Методические аспекты	615
13.2.1. Выделение органических кислот	615
13.2.2. Получение производных органических кислот	616
13.2.3. Предварительное фракционирование	617
13.2.4. Разделение и обнаружение	619
13.3. Органические кислоты как маркеры нарушений метаболизма	622
13.3.1. Врожденные нарушения метаболизма	623
13.3.2. Диабетический кетоацидоз	631
13.3.3. Заболевания, вызываемые катехоламинами, серотонином и их метаболитами	638
Литература	642

14. Вторичные растительные метаболиты

К. Хостетман, М. Хостетман

14.1. Введение	645
14.2. Растительные фенольные соединения	646
14.2.1. Флавоноидные агликоны	646
14.2.2. Флавоноидные гликозиды	649
14.2.3. Ксантоны	650
14.2.4. Антрахиноны, хиноны и родственные соединения	651
14.2.5. Другие растительные фенольные соединения	652
14.3. Терпеноидные агликоны	653
14.4. Терпеноидные и стероидные гликозиды	654
14.4.1. Иридоидные и секоиридоидные гликозиды	654
14.4.2. Сапонины	656
14.4.3. Сердечные гликозиды	658
14.4.4. Различные гликозиды	659
14.5. Алкалоиды	660
14.5.1. Пуриновые алкалоиды	660
14.5.2. Морфиновые алкалоиды	661
14.5.3. Пирролизидиновые алкалоиды	662
14.5.4. Индольные алкалоиды	663
14.5.5. Другие алкалоиды	664
14.6. Неалкалоидные азотсодержащие вещества	665
14.7. Выводы и перспективы	665
Литература	666

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Учебные издания

Герман Бауэр, Хейнц Энгельгард,
Агнес Хеншен и др.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В БИОХИМИИ

Редакторы Агнес Хеншен, Клаус-Петер
Хупе, Фридрих Лотшлайх, Вольфганг
Вёльтер

Зав. редакцией академик О. А. Реутов
Зам. зав. редакцией З. Ф. Ходецкая
Старший научный редактор Р. И. Краснова
Младший редактор И. С. Ермилова
Художник В. И. Шаповалов
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технический редактор И. И. Володина
Корректор Т. П. Пашковская

ИБ № 6325

Сдано в набор 17.12.87. Подписано к печати
06.06.88. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага кн.-журнал.
Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем
21,5 бум. л. Усл. печ. л. 43,0. Усл. кр.-отт. 43,0.
Уч.-изд. л. 47,97. Изд. № 3/5315. Тираж 3800 экз.
Зак. 1489. Цена 9 руб.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

В/О «Совэкспорткинг» Государственного коми-
тета СССР по делам издательств, полиграфии и
книжной торговли.

129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам из-
дательств, полиграфии и книжной торговли.

113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1.